

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS E AGRÍCOLA

Fevereiro - 1984

OCORRÊNCIA DE CAMPYLOBACTER FETUS
SUB-ESPÉCIE JEJUNI EM CARÇAÇAS DE
FRANGOS, SUÍNOS E BOVINOS.

PAULO FERNANDO DE ALMEIDA

ORIENTADOR

PROF. DR. ANTÔNIO DE MELO SERRANO

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do Título de Mestre em Ciência de Alimentos.

*Este exemplar corresponde a redação final da tese defendida por Paulo Fernando de Almeida e aprovada pela Comissão Julgadora em 13.03.84
Campinas, 13 de março de 1984.*

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

Paulo Fernando de Almeida

A meu pai,

orientador primeiro

AGRADECIMENTOS

À minha esposa Rogeria, pelo carinho, paciência, dedicação e apoio, imprescindíveis na realização deste trabalho.

Ao Professor Dr. Antonio de Melo Serrano, pela orientação, incentivo e amizade.

À Bibliotecária, D. Angelina, pela grande amizade.

Ao Professor Dr. Fumio Yokoya por nos ter facultado o uso do microscópio de fase.

Às empresas PFIZER, ELI LILLY e INC-LABORFARMA pela doação dos antibióticos.

Ao Lúcio, Jair e Fernando, companheiros de trabalho.

À CAPES pela ajuda financeira.

Aos matadouros FRIPAL, MACUCO e BON-BEEF, e aos funcionários da Inspeção Federal que nos forneceram as amostras.

À Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola da Universidade Estadual de Campinas, à Universidade Federal da Bahia e à Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

À toda minha família, que por acreditar em mim, me estimularam a procurar mais e melhor.

ÍNDICE

	PÁGINA
Índice de Quadros.....	i
Resumo.....	ii
Summary.....	iv
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. Taxonomia e nomenclatura.....	3
2.2. Características do microrganismo.....	6
2.2.1. Caracteres morfológicos.....	6
2.2.2. Caracteres culturais e bioquímicos.....	8
2.2.2.1. Produção de catalase e sulfeto de hidrogênio.....	12
2.2.2.2. Crescimento em diferentes atmosferas de oxigênio.....	14
2.2.2.3. Crescimento em meios basais contendo cloreto de sódio, glicina, bile e glicose.....	14
2.2.2.4. Crescimento a várias temperaturas.....	16
2.2.2.5. Sensibilidade a determinados compostos químicos e antimicrobianos.....	17
2.2.2.6. Hidrólise do hipurato.....	19
2.2.3. Métodos para isolamento de <u>C. fetus</u> sub-espécie <u>jejuni</u>	20
2.2.3.1. Tratamento das amostras.....	22
2.2.3.2. Meios para recuperação e isolamento.....	23
2.2.3.3. Temperatura e pH.....	33
2.2.3.4. Atmosfera micro-aeróbia.....	33
2.2.4. Capacidade de sobrevivência do <u>C. fetus</u> sub-espécie <u>jejuni</u>	36

2.2.5. Manutenção e preservação das culturas.....	40
2.2.6. Distribuição nos animais.....	42
2.2.7. Distribuição nas carcaças e alimentos crus de origem animal.....	49
2.2.8. Epidemiologia.....	52
2.2.9. Gastro-enterite humana.....	59
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	64
3.1. Material.....	64
3.1.1. Carcaças.....	64
3.1.2. Material de laboratório.....	64
3.2. Métodos.....	65
3.2.1. Coleta e tratamento das amostras.....	65
3.2.2. Atmosfera de incubação.....	66
3.2.3. Contagem, isolamento e confirmação.....	67
3.2.4. Testes bioquímicos e fisiológicos.....	68
3.2.4.1. Formação de células cocóides.....	68
3.2.4.2. Crescimento em ágar nutriente simples.....	68
3.2.4.3. Produção de catalase e oxidase.....	68
3.2.4.4. Teste para fermentação e oxidação da glicose.....	69
3.2.4.5. Redução de nitratos a nitritos.....	70
3.2.4.6. Produção de sulfeto de hidrogênio.....	70
3.2.4.7. Crescimento em 1% de glicina, 8% de glicose e 3,5% de cloreto de sódio.....	71

3.2.4.8. Crescimento a 25° e 42°C.....	71
3.2.5. Testes de tolerância.....	71
3.2.5.1. Crescimento em verde brilhante.....	72
3.2.5.2. Crescimento em cloreto de 2.3.5 -trifeniltetrazoli um	72
3.2.5.3. Crescimento em aerobiose e anaerobiose.....	72
3.2.5.4. Sensibilidade ao ácido nalidíxico.....	72
3.2.6. Manutenção das culturas.....	73
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	74
4.1. Da identificação das cepas do microrganismo.....	74
4.1.1. Morfologia.....	74
4.1.2. Comportamento cultural, bioquímico-fisiológico e de sensibilidade.....	76
4.1.2.1. Produção de catalase e oxidase.....	76
4.1.2.2. Redução de nitratos.....	77
4.1.2.3. Fermentação e oxidação de carboidratos.....	77
4.1.2.4. Produção de sulfeto de hidrogênio.....	78
4.1.2.5. Crescimento em ágar nutriente simples.....	78
4.1.2.6. Crescimento em glicina, cloreto de sódio e glic <u>o</u> se	79
4.1.2.7. Crescimento às temperaturas de 25°, 37° e 42°C....	79
4.1.2.8. Crescimento em aerobiose, micro-aerobiose e anaer <u>o</u> biose	79
4.1.2.9. Sensibilidade ao ácido nalidíxico, cloreto de tri feniltetrazolium e verde brilhante.....	80
4.2. Do exame das carcaças.....	82

4.2.1. Carcaças de frangos.....	82
4.2.2. Carcaças de suínos.....	84
4.2.3. Carcaças de bovinos.....	85
5. CONCLUSÕES.....	92
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	93

ÍNDICE DE QUADROS

QUADRO	PÁGINA
1. Nomenclaturas usadas para classificar os campilobacteres produtores de catalase.....	5
2. Características bioquímicas e fisiológicas do gênero <u>Campylobacter</u>	11
3. Taxas de isolamento de <u>Campylobacter fetus</u> sub-espécie <u>jejuni</u> de fezes humanas.....	62
4. Comportamento morfológico, cultural, bioquímico, fisiológico e de sensibilidade das cepas de <u>C. fetus</u> ssp. <u>jejuni</u> isoladas de carcaças de frangos.....	87
5. Comportamento morfológico cultural, bioquímico, fisiológico e de sensibilidade das cepas de <u>C. fetus</u> ssp. <u>jejuni</u> isoladas de carcaças de suínos.....	88
6. <u>C. fetus</u> ssp. <u>jejuni</u> em 120 carcaças frescas de animais de abate.....	89
7. Contagens de <u>C. fetus</u> ssp. <u>jejuni</u> em carcaças de frangos	90
8. Contagens de <u>C. fetus</u> ssp. <u>jejuni</u> em carcaças de suínos.	91

RESUMO

Para se pesquisar a ocorrência de C. fetus sub-espécie jejuni foram analisadas 120 amostras de carcaças frescas evisceradas provenientes de matadouros sob Inspeção Federal, sendo 40 de frangos de 55 - 60 dias, abatidos num matadouro localizado em Paulínia, 40 de suínos com cerca de 8 meses, de dois matadouros localizados em Piracicaba e Vinhedo e 40 de bovinos adultos, de dois matadouros localizados em Piracicaba e Valinhos, todos no estado de São Paulo. A colheita foi feita durante o período de outubro de 1981 a janeiro de 1982.

As amostras de frangos foram retiradas sobre a pele das regiões peitoral, ventral e dorsal, imediatamente antes da embalagem. As amostras de suínos e bovinos foram retiradas das meias-carcaças após a lavagem final, nas regiões dos músculos do pescoço, na parede abdominal interna, próximo à última costela e à rafe e nos músculos adutores da coxa, no local por onde a serra os dividiu.

Cada amostra de carcaça foi obtida com auxílio de zaragatoas sobre uma superfície de 15 cm², nas três regiões mencionadas, sendo portanto de 45 cm² a área total analisada. O material era colocado em tubos com água peptonada a 0,1 % e transportado ao laboratório, sob refrigeração, onde se procedia a análise dentro das três horas após a coleta. Após homogenização, alíquotas das diluições decimais foram espalhadas com alça de Drigalski em placas com ágar seletivo para campilobacter. A incubação se fazia a 42°C em atmosfera micro-aeróbia por 72 horas.

Dez por cento das colônias típicas foram submetidas à verifi

cação da morfologia e motilidade em microscopia de fase e à reação ao Gram. As culturas purificadas foram confirmadas por testes culturais, bioquímico-fisiológicos e de sensibilidade. As cepas de C. fetus sub-espécie jejuni isoladas de frangos e suínos foram submetidas a tentativas para caracterização e diferenciação.

Os testes efetuados para diferenciação das cepas do microrganismo apresentaram resultados variáveis, mas a tolerância a 1,0 mg de cloreto de trifenil tetrazolium por ml de meio e, em menor extensão, a produção de sulfeto de hidrogênio em meio padrão permitiram diferenciar a maioria das cepas. Com base nestes testes, a maioria das cepas isoladas de frangos assemelham-se ao C. jejuni e as de suíno ao C. coli.

O C. fetus sub-espécie de jejuni foi confirmado em 47,5% das amostras de frangos e 35,5% das amostras de suínos. O organismo foi detectado em níveis de menos de 10 células viáveis por cm² em 1 amostra de frango e 7 de suínos, entre 10 e 100 células viáveis por cm² em 16 amostras de frangos e 7 de suínos. O nível mais elevado de contaminação foi de mais de 100 células viáveis por cm² em duas carcaças de frangos. As amostras de bovinos não apresentaram o microrganismo.

Os resultados indicam que carcaças de frangos e suínos devem ser consideradas como prováveis veículos do microrganismo para o homem, no Brasil.

SUMMARY

In order to investigate the occurrence of Campylobacter fetus sub-espécie jejuni 120 samples of fresh eviscerated animal carcasses from slaughterhouses under Federal Inspection were examined. Forty out of these samples came from chickens aged 55-60 days slaughtered at a Paulínia slaughterhouse, 40 came from 8 month-old swines from two slaughterhouses at Piracicaba and Vinhedo and 40 came from adult cattle of two slaughterhouses at Piracicaba and Valinhos, all in São Paulo state. Samples were collected during october 1981-january of 1982.

Chicken samples were removed from the skin surface of the pectoral, ventral and dorsal regions, just prior to bagging. Swine and cattle samples were removed from the neck muscles, in the internal abdominal wall near the last rib and at "linea alba" and the thigh adductors muscles from the cut surface of half carcasses after final rinsing. Each carcass sample was obtained with swabs on a 15 cm² surface on the three mentioned regions. Therefore, the total examined area was 45 cm². The material was placed in screw-cap tubes with 0,1% peptone water and transported in a cooling box to the laboratory, where the analysis were performed within 3 hours of sampling. After homogenizing, diluted decimal aliquots were spread with Drigalski spatula in plates with seletive agar for Campylobacter. The plates were incubated at 42°C in microaerophilic atmosphere for 72 hours.

Ten percent of the typical colonies were submitted to morphology and motility observations in phase microscopy and at the Gram staining. The purified cultures were confirmed by cultural, biochemical-physiological and sensibility tests. C.fetus ssp jejuni strains isolated from chickens and pigs were submitted to characterization and differentiation trials.

The tests carried out differentiate the organism strains showed variable results. The tolerance to 1,0 mg of triphenyl tetrazolium chloride per ml and in minor extension, the hydrogen sulphide production on basal medium allowed to differentiate the majority of the strains. Based on these tests, the majority of isolated chicken strains was similar to Campylobacter jejuni and those of swine to Campylobacter coli.

Campylobacter fetus subspécie jejuni was confirmed in 45% of the chicken samples and 35,5% of the swine samples. The organism was detected at levels lower than 10 viable cells by cm² in one chicken sample and 7 of swine, between 10 and 100 viable cells by cm² in 16 chicken samples and 7 of swine. The highest contamination level had more than 100 viable cells by cm² in two chicken carcasses. The bovine samples did not present the organism.

The results indicate that chicken and swine carcasses should be considered as probable vehicles of the microorganism to human beings in Brasil.

1. INTRODUÇÃO

Objetivo do trabalho

Muito embora as espécies do gênero Campylobacter já tivessem sido reconhecidas como agentes responsáveis por várias doenças animais, somente recentemente é que o Campylobacter fetus sub-espécie jejuni vem sendo incriminado por grande parte dos casos de gastroenterites em seres humanos de diversos países (DOYLE, 1981). No Brasil, esta doença foi diagnosticada em crianças, nos estados do Rio de Janeiro (RICCIARDI et al., 1979), Pernambuco (MAGALHÃES, ARAÚJO & SILVA, 1982) e São Paulo (FERNANDEZ et al., 1982).

O C. fetus sub-espécie jejuni tem sido isolado de fezes e de carcaças de animais de abate tais como bovinos, ovinos, suínos, frangos e perus (BLASER, 1982), bem como de miúdos comestíveis dessas aves (CHRISTOPHER, SMITH & VANDERZANT, 1982b) e de carne bovina moída (SVEDHEM, KAIJSER & SJÖGREN, 1981). Embora na maioria dos casos de campilobacteriose humana, a fonte do microrganismo não tenha sido identificada, existem evidências circunstanciais que os alimentos particularmente de origem animal, estão implicados na transmissão do C. fetus sub-espécie jejuni a indivíduos suscetíveis. Neste sentido, já existem mesmo relatos considerando esta doença uma toxinfecção alimentar, associada com a ingestão de leite cru (TAYLOR, WEINSTEIN & BRYNER, 1979), hamburguer (OOSTEROM et al., 1980), frangos mal-cozidos (HAYEK & CRUICKSHANK, 1977) e produtos alimentícios contendo carne de porco (PEEL & McINTOSCH, 1978).

Em São Paulo, até à presente data, não conhecemos qualquer es

tudo ou publicação a respeito da presença do Campylobacter fetus sub-espécie jejuni em alimentos.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a ocorrência desse microorganismo em carcaças de bovinos, suínos e frangos através de técnicas adequadas às nossas condições de trabalho. Algumas tentativas foram feitas para caracterizar e diferenciar as cepas isoladas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Taxonomia e nomenclatura

SEBALD & VÉRON (1963) criaram o gênero Campylobacter (do grego campylo= curvo e bacter=bastão) para incluir os organismos originalmente classificados no gênero Vibrio (SMITH & TAYLOR, 1919) mas que diferiam dos víbrios clássicos por serem micro-aeróbios, por não oxidarem nem fermentarem carboidratos e por apresentarem na molécula de ácido desoxirribonucleico, guanina e citosina, num percentual molar de 30 a 35. Segundo SMIBERT (1974), os campilobacteres constituem um grupo bem definido de organismos cilíndricos, delgados e curvos, Gram negativos, móveis por flagelos polares, micro-aeróbios de metabolismo bastante limitado, incluídos na família Spirillaceae.

De acordo com SMIBERT (1974 e 1978), os organismos do gênero Campylobacter são divididos primariamente em dois grupos com base em sua capacidade de produzir catalase.

Os campilobacteres produtores de catalase são mais importantes do ponto de vista patogênico. Dentre estes, o Campylobacter fetus apresenta três sub-espécies: C. fetus sub-espécie fetus, encontrado principalmente no trato reprodutivo dos bovinos, nas fêmeas em processo infeccioso; o C. fetus sub-espécie intestinalis que ocasiona doenças no trato digestivo e reprodutivo dos animais e apenas ocasionalmente causa doenças sistêmicas e diarréia em seres humanos debilitados; e o C. fetus sub-espécie jejuni que é encontrado no tratodigestivo da maioria dos animais, produz aborto em ovi

nos e atualmente ocasiona gastroenterites em seres humanos. Há ainda o C. fecalis que provoca distúrbios intestinais em bovinos (AL-MASH & TAYLOR, 1981).

Os campilobacteres incapazes de produzir catalase são comensais encontrados na cavidade oral do homem (C. sputorum sub-espécie sputorum) e no trato genital de bovinos e ovinos (C. sputorum sub-espécie bubulus). Por outro lado, o C. sputorum sub-espécie mucosalis tem sido isolado da cavidade oral e de lesões intestinais de suínos (SMIBERT, 1978).

As cepas de C. fetus sub-espécie jejuni foram originalmente descritas como Vibrio jejuni por JONES, ORCUTT & LITTLE (1931), como organismos relacionados aos vibrios ("related vibrios") por KING (1957), devido apresentarem morfologia e motilidade similares à dos vibrios, mas com a propriedade específica de crescerem a 42°C, e como Vibrio coli por DOYLE (1948). De acordo com a classificação de VÉRON & CHATELAIN (1973) e SKERMAN, MCGOWAN & SNEATH (1980), esses microrganismos foram divididos em duas espécies distintas, o C. coli e o C. jejuni. Entretanto, até o presente momento, as características apresentadas por essas espécies tolerantes ao calor não permitem distingui-las precisamente.*

Em decorrência da existência de várias terminologias diferentes, apresentamos no quadro 1 as diversas classificações e nomenclaturas.

* Manuscrito de PARK, SMIBERT, BLASER, VANDERZANT & STERN, a publicar.

QUADRO 1 - NOMENCLATURAS USADAS PARA CLASSIFICAR OS CAMPILOBACTERES PRODUTORES DE CATALASE (ADAPTAÇÃO DO QUADRO DE DOYLE, 1981)

AUTORES								
SKERMAN et al. (1980)	SMIBERT (1974)	VÉRON & CHATE LAIN (1973)	BERG et al. (1971)	ELAZHARY (1968)	BRYNER et al. (1962)	KING (1962)	MOHANTY et al. (1962) FLORENT (1959)	
<u>C. fetus ssp. venerealis</u>	<u>C. fetus ssp. fetus</u>	<u>C. fetus var. venerealis</u> e biotipo <u>intermedius</u>	<u>Vibrio fetus</u> sorotipos A-1 e A sub 1	<u>V. fetus var. venerealis</u> e subtipo 1 <u>intermedius</u>	<u>V. fetus</u> tipo I e subtipo 1	<u>V. fetus</u>	<u>V. fetus</u> tipo I e III	<u>V. fetus var. venerealis</u> e biotipo <u>intermedius</u>
<u>C. fetus ssp. fetus</u>	<u>C. fetus ssp. intestinalis</u>	<u>C. fetus ssp. fetus</u>	<u>Vibrio fetus</u> sorotipos A-2 e B	<u>V. fetus var. intestinalis</u>	<u>V. fetus</u> tipo 2	<u>V. fetus</u>	<u>V. fetus</u> tipo II	<u>V. fetus var. intestinalis</u>
<u>C. jejuni</u>	<u>C. fetus ssp. jejuni</u>	<u>C. jejuni</u>	<u>Vibrio fetus</u> sorotipo C	<u>V. jejuni</u>		"relacionados a vibrios "		<u>Vibrio coli-jejuni</u> (grupo)
<u>C. coli</u>	<u>C. fetus ssp. jejuni</u>	<u>C. coli</u>		<u>V. coli</u>		"relacionados a vibrios "		<u>Vibrio coli-jejuni</u> (grupo)
<u>C. fecalis</u>	<u>C. fecalis</u>		<u>V. fecalis</u>					

2.2. Características dos microrganismos

2.2.1. Caracteres morfológicos

Os campilobacteres tolerantes ao calor são bactérias asporuladas, Gram-negativas, pequenas e delgadas (0,2 a 0,8 μm x 1,5 a 5,0 μm de comprimento), que apresentam formas cilíndricas curvas, isolados, em espirais, como a letra S, lembrando vírgulas e asas de pássaros, com extremidades pontiagudas. Podem ainda se apresentar sob formas espirais filamentosas longas de até 8,0 μm de comprimento, bem como sob formas esféricas ou cocóides, especialmente em culturas velhas. Estes organismos apresentam ainda motilidade ativa e rápida, assemelhando-se a um saca-rolha, através de um ou dois flagelos situados nas extremidades da célula (SMIBERT, 1974; SMIBERT, 1978; MORRIS & PARK, 1971). KARMALI, ALLEN & FLEMING (1981), relatam diferenças morfológicas significativas entre as espécies do gênero Campylobacter. Dentre estas, as células do grupo coli / jejuni são geralmente menores, mas há formas longas que se apresentam com as espirais fechadas.

De acordo com SKIRROW & BENJAMIN (1980a), a morfologia celular dos membros deste gênero varia segundo as condições da cultura: na fase logarítmica de crescimento os microrganismos são curtos e extremamente móveis, mas com o envelhecimento da cultura as células tornam-se mais longas e menos móveis; as células do grupo coli / jejuni apresentam-se invariavelmente sob formas cocóides em culturas velhas ou após permanecerem em aerobiose por 24 a 48 horas e são geralmente inviáveis. Algumas culturas após sucessivos

repiques podem adquirir formas cilíndricas retas.

Quanto ao aspecto morfológico das colônias, os microrganismos do grupo coli / jejuni apresentam, em ágar nutriente, colônias tipicamente redondas com 1 a 2 mm de diâmetro, lisas, convexas, inteiras, brilhantes e translúcidas. Um outro tipo de colônia apresentado é baixo, finamente granular, translúcido e com bordos irregulares (SMIBERT, 1974). DEAS (1960) verificou que o C. fetus subespécie jejuni pode ainda apresentar um crescimento difuso com tendência a espalhar-se na superfície do meio, especialmente em atmosfera úmida. Segundo SKIRROW & BENJAMIN (1980a), este crescimento é característico do C. jejuni, e pode ser evitado usando-se meios de cultura com mais de 2 % de ágar. De acordo com os últimos autores, ocasionalmente uma cepa origina colônias discretas de várias formas em uma única cultura. Ainda, as colônias de C. fetus subespécie jejuni tendem a aumentar de tamanho e adquirir uma coloração bronzeada, com o centro ligeiramente opaco, relacionados com o envelhecimento da cultura. De acordo com BUCK & KELLY (1981), a morfologia das colônias do organismo varia com o teor de umidade na superfície do meio, sendo difusas e coalescentes em meio úmido, distintas em placas secas e com característica intermediária quando em placas ligeiramente úmidas.

Segundo SMIBERT (1974), as colônias em ágar sangue são de aparência cinza-esbranquiçada e não apresentam hemólise.

O crescimento em meio semi-sólido com 0,16 % de ágar ocorre entre 2 a 3 mm abaixo da superfície do meio, na forma de um anel característico, que se torna abundante na porção superior do meio após 48 horas à temperatura de 37°C (SMIBERT, 1974; SKIRROW &

BENJAMIN, 1980a). O crescimento em caldo resulta geralmente num sedimento butiroso (SMIBERT, 1974).

2.2.2. Caracteres culturais e bioquímicos

Os campilobacteres apresentam requisitos nutricionais e fisiológicos muito variados. Os organismos do grupo C. fetus são microaeróbios a anaeróbios que requerem para crescimento e desenvolvimento uma tensão atmosférica de 3 a 15 % de oxigênio (SMIBERT, 1974). Em 1956, KIGGINS & PLASTRIDGE verificaram que tanto o oxigênio como o anidrido carbônico são requeridos numa concentração ótima de 5 a 10 %, respectivamente. Os campilobacteres tolerantes ao calor (C. coli e C. jejuni) crescem bem sob tensão reduzida de oxigênio, embora a atmosfera ótima para crescimento seja de 3 a 6 % de oxigênio e 2 a 10 % de anidrido carbônico.* De acordo com KIGGINS & PLASTRIDGE (1956), a concentração de oxigênio presente no ar à pressão atmosférica normal tem efeito bacteriostático para o C. fetus. As razões do efeito tóxico ou inibitório do oxigênio para as bactérias micro-aeróbias ainda não são bem compreendidas (HOFFMAN; KRIEG & SMIBERT, 1979b), porém a adição de enzimas como a catalase e dismutase superóxido ao meio de cultura, reduz a toxicidade do ambiente e permite melhor crescimento de organismos micro-aeróbios (KINGSCOTE, 1961). Do mesmo modo, GEORGE et al. (1978) verificaram que a adição de sulfato ferroso, piruvato de sódio e meta-bissulfito de sódio ao ágar para brucela permitiu o crescimento do C. fetus sub-espécie jejuni, mesmo em teores de 17 a 21 % de oxigênio. Estes suplementos atuam quelando ânions superóxidos

* Manuscrito de PARK et al., a publicar.

e outros radicais livres no meio e não sobre o metabolismo celular (HOFFMAN et al., 1979a).

Segundo SMIBERT (1974, 1978), os campilobacteres são organismos quimiorganotróficos, com metabolismo essencialmente respiratório, que obtêm energia de aminoácidos ou de substratos intermediários do ciclo dos ácidos tricarboxílicos e não possuem atividade metabólica sobre carboidratos e lipídios, nem tampouco hidrolizam a uréia e a gelatina. Do mesmo modo não produzem indol nem pigmentos, mas produzem oxidase e reduzem nitratos a nitritos.

De acordo com SMIBERT (1963), as cepas de C. fetus exigem, como requisitos nutricionais mínimos a vitamina niacina e cerca de 18 aminoácidos, principalmente ácido glutâmico, ácido aspártico, leucina, alanina e arginina.

ZEMJANIS & HOYT (1960) verificaram que a adição de cisteína, lactato, α ceto-glutarato, ácido glutâmico, glutamina, uracila, tiamina, ácido para-aminobenzóico, 17-beta-estradiol, magnésio, manganês e ferro estimularam o crescimento do C. fetus. Por sua vez, LOESCHE, GIBBONS & SOCRANSKY (1965), relataram que a adição de nitrato ao meio de cultura melhorava o crescimento dos campilobacteres, provavelmente, devido a sua utilização como agente oxidante ou como fonte de nitrogênio. Entretanto, RAZI, PARK & SKIRROW (1981), verificaram que as cepas de C. fetus crescem anaerobiamente na presença de nitrato e L-aspartato, mas isto não ocorre com as cepas do grupo coli / jejuni.

Segundo MORRIS & PARK (1971), SKIRROW (1977), HOLDEMAN CATO & MOORE (1977) os meios sólidos ou líquidos mais comumente empregados para o crescimento e desenvolvimento do C. fetus são constituídos de extrato

de levedura, autolizado de levedura, extrato de carne, fígado digerido, peptona, bissulfito de sódio, sangue ou hematina, ágar e principalmente em condições físico-químicas adequadas, tais como pH e osmolaridade (LOWRIE, PEARCE & KENNEDY, 1974).

De acordo com SMIBERT (1974), os meios de cultura para crescimento de C. fetus sub-espécie jejuni devem ter o pH ajustado para 7,0.

O C. fetus sub-espécie jejuni apresenta crescimento e desenvolvimento ótimos em atmosfera micro-aeróbia a 42°C (SKIRROW, 1977).

Os organismos do gênero Campylobacter podem ser identificados primariamente por seus caracteres morfológicos, motilidade, coloração e aspectos culturais. Entretanto, para caracterização e identificação das espécies e sub-espécies, existem vários critérios bioquímicos e fisiológicos, dentre os quais destacamos os seguintes: produção de catalase, produção de sulfeto de hidrogênio em diferentes meios, redução de nitritos, redução de selenito (SMIBERT, 1974; HOLDEMAN et al., 1977), crescimento em aerobiose, anaerobiose e micro-aerobiose (HOLDEMAN et al., 1977), crescimento em meios com 3,5 % de NaCl, 1 % de glicina (SMIBERT, 1974), 1 % de bile (DOYLE, 1981), 8 % de glicose (VÉRON & CHATELAIN, 1973), crescimento em diferentes temperaturas (KING, 1962), sensibilidade ao verde brilhante, cloreto de trifeniltetrazolium, ácido nalidíxico (VÉRON & CHATELAIN, 1973), cefalotina (DOYLE, 1981).

Apresentamos no quadro 2 as principais características diferenciais das espécies de campilobacteres.

QUADRO 2 - CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS E FISIOLÓGICAS DO GÊNERO CAMPYLOBACTER (ADAPTADO DE HOLDEMAN ET AL., 1977; VÉRON & CHATELAIN, 1973; SMIBERT, 1974; LEAPER & OWEN, 1981; SKIRROW & BENJAMIN, 1980a)

Características Espécies	açúcar O/F	catalase	oxidase	redução nitratos	redução nitritos	Produção de H ₂ S			Crescimento em							Sensibilidade							
						TSI	meio sensível*	meio padrão**	glicina 1 %	glicose 8 %	NaCl 3,5 %	bile 1,0 %	25°C	42°C	aerobiose	5 % O ₂	anaerobiose	verde-brilhante 10 µg/ml	verde-brilhante 30 µg/ml	CTT***- 1 mg	CTT - 0,4 mg	ácido nalidixico 30-40 µg/ml	hidrólise do hipurato
<u>C. fetus</u> sub-espécie <u>fetus</u>	-/-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	f	+	+	-	-	R	-
<u>C. fetus</u> sub-espécie <u>intestinalis</u>	-/-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+	f	+	+	-	-	R	-
<u>C. fetus</u> sub-espécie <u>jejuni</u>	-/-	+	+	+	-	-	+	√(a)	+	+/- (b)	-	+	-	+	-	+	f	+/- (b)	-	+/- (c)	-	S	+/- (d)
<u>C. fecalis</u>	-/-	+	+	+	?	+	+	+	+	+	v	v	-	+	-	+	+	?	?	?	?	?	-
<u>C. sputorum</u> sub-espécie <u>bubulus</u>	-/-	-	+	+	+	+	+	+	+	?	+	v	v	v	-	+	+	?	?	?	?	?	-
<u>C. sputorum</u> sub-espécie <u>sputorum</u>	-/-	-	+	+	+	+	+	+	+	?	-	+	+	-	-	+	+	?	?	?	?	?	-

(O/F): oxidação/fermentação

(v) : reação variável

(f) : reação ou crescimento fracamente positivos

(R) : resistente

(S) : sensível

(-) : reação ou crescimento negativos

(+) : reação ou crescimento positivos

(a): C. coli produz mais H₂S que C. jejuni

(b): C. coli cresce enquanto C. jejuni não

(c): C. coli cresce enquanto 82% de C. jejuni não

(d): C. coli não hidrolisa o hipurato enquanto o C. jejuni sim

* : meio Albimi com 0,02. % de cistina ou cisteína

** : meio Albimi sem cistina ou cisteína

***: cloreto de trifeniltetrazolium

2.2.2.1. Produção de catalase e sulfeto de hidrogênio

Em 1954, REICH (apud KIGGINS & PLASTRIDGE, 1956) verificou que o V. fetus (C. fetus sub-espécie fetus) produzia a enzima catalase. Posteriormente, BRYNER & FRANK (1955) verificaram que os campilobacteres produtores de catalase, isolados de processos infecciosos genitais de bovinos, não produziam sulfeto de hidrogênio através da técnica de papel de filtro impregnado com acetato de chumbo. Por outro lado, os campilobacteres saprófitas frequentemente encontrados nos materiais de análise e não relacionados a doenças clínicas, não apresentavam catalase mas produziam grande quantidade do gás. Estes últimos foram denominados por FLORENT (1953) de V. bubulus (C. sputorum sub-espécie bubulus).

Do mesmo modo, FLORENT (apud ELAZHARY, 1968) e DEAS (1960), verificaram que os campilobacteres produtores de catalase, isolados de suínos, podiam ser diferenciados em dois tipos com base na produção de sulfeto de hidrogênio em meios sem cistina. As cepas produtoras de sulfeto de hidrogênio foram relacionadas ao V. coli (C. coli), enquanto as não produtoras ao V. fetus var. intestinalis (C. fetus sub-espécie intestinalis).

DILIELLO, POELMA & FABER (1959) verificaram que as cepas patogênicas de C. fetus isoladas de bovinos não produziam sulfeto de hidrogênio em meio padrão (meio basal sem cisteína) e meio sensível (meio basal com 0,003 % de cisteína), mas as cepas oriundas de ovinos e seres humanos produziam o gás em pequena quantidade. Para execução destes testes, FLORENT (1959) recomenda a adição de hidrocloreto de cistina a 0,02 % ao invés de cisteína. A propósito

FIREHAMMER (1965) isolou cepas de campilobacteres catalase-positivas a partir de fezes de ovinos normais, que produziam elevado teor de sulfeto de hidrogênio, tanto em meio padrão e meio sensível como também na base do ágar inclinado tríplice-açúcar-ferro. O autor propôs o nome de V. fecalis (C. fecalis) para diferenciá-los dos outros campilobacteres.

No MANUAL DE BERGEY, SMIBERT (1974) relaciona o C. fetus subespécie fetus, C. fetus sub-espécie intestinalis, C. fetus sub-espécie jejuni e C. fecalis como produtores de catalase, para diferenciá-los do C. sputorum sub-espécie sputorum e C. sputorum sub-espécie bubulus, tipicamente não produtores de catalase. Com relação a produção de sulfeto de hidrogênio, somente o C. fetus sub-espécie fetus não produz o gás em meio padrão. Por outro lado, somente as espécies de C. sputorum e C. fecalis são capazes de produzir sulfeto de hidrogênio em ágar tríplice-açúcar-ferro.

Segundo SKIRROW & BENJAMIN (1980a), os testes para produção de sulfeto de hidrogênio são úteis para diferenciar os campilobacteres. De modo geral, as cepas de C. coli são mais ativas que as do C. jejuni e C. fetus sub-espécie fetus; entretanto, estes testes são de difícil padronização e quantificação. Em outro trabalho, SKIRROW & BENJAMIN (1980b) verificaram que era possível identificar biotipos de C. jejuni e C. coli de acordo com a produção de sulfeto de hidrogênio em caldo nutriente semi-sólido com sulfato ferroso. Nesse meio, somente o C. jejuni biotipo 2 produzia sulfeto de hidrogênio.

2.2.2.2. Crescimento em diferentes atmosferas de oxigênio

FLETCHER & PLASTRIDGE (1964a) verificaram que os C. fetus crescem bem em teores de 2,5 % de oxigênio, mas são incapazes de crescer sob condições exclusivamente anaeróbia ou aeróbia, no isolamento primário. Por outro lado, os campilobacteres saprófitas apresentam a posição mais anaeróbia dentre os campilobacteres. De acordo com VÉRON & CHATELAIN (1973), o C. coli é o campilobacter mais aero-tolerante, e apresenta a mais rápida velocidade de crescimento. Do mesmo modo, HOLDEMAN et al. (1977) relatam que os campilobacteres não apresentam crescimento sob condições aeróbias, mas crescem bem em atmosfera micro-aeróbia (5 % de oxigênio). No entanto, em condições anaeróbias, os campilobacteres do grupo C. fetus podem crescer ligeiramente, enquanto o C. sputorum e o C. fecalis crescem abundantemente. Segundo SMIBERT (1974), ocasionalmente algumas cepas de campilobacteres podem crescer ligeiramente sob condições aeróbias.

A atmosfera ótima para desenvolvimento dos campilobacteres termotolerantes deve conter 3 a 6 % de oxigênio e 2 a 10 % anidrido carbônico.*

2.2.2.3. Crescimento em meios basais contendo cloreto de sódio, glicina, bile e glicose

KUZDAS & MORSE (1956) estudando a tolerância dos campilobacteres oriundos de ovinos, bovinos e seres humanos, em meios com cloreto de sódio, verificaram que somente os campilobacteres saprófi

* Manuscrito de PARK et al., a publicar.

tas cresciam em concentraçãõ de 3,5 % de sal. Do mesmo modo, DILLIE LLO et al. (1959) e FLORENT (1959), verificaram que as cepas de V. bubulus (C. sputorum sub-espécie bubulus) e alguns víbrios aeróbicos cresciam no meio àquela concentraçãõ do sal, enquanto que as cepas do grupo V. fetus (C. fetus sub-espécie fetus e C. fetus sub-espécie intestinalis) e inclusive o grupo coli / jejuni, nãõ apresentaram crescimento. BRYANS & SMITH (1960), ELAZHARY (1968) e SMIBERT (1969), estudando cepas de campilobacteres isolados de bovinos, ovinos e frangos, verificaram que as cepas de C. fetus nãõ cresciam em meios com 3,5 % de cloreto de sódio. De acordo com SMIBERT (1974), HOLDEMAN et al. (1977) e VÉRON & CHATELAIN (1973), somente o C. sputorum sub-espécie bubulus e menos frequentemente C. fecalis podem apresentar crescimento em meios com 3,5 % de cloreto de sódio. Mais recentemente SKIRROW & BENJAMIN (1980a) relataram que as cepas do C. fetus sub-espécie jejuni nãõ crescem em meios com 1,5 % de cloreto de sódio, o que permite diferenciá-las dos campilobacteres termófilos resistentes ao ácido nalidíxico isolados de gaivotas.

LECCE (1958) e MOHANTY, PLUMER & FABER (1962) comprovaram que todos os campilobacteres, com exceçãõ do C. fetus sub-espécie fetus, sãõ capazes de crescer em meios com 1 % de glicina. Embora esta característica tenha sido relatada também por SMIBERT (1974), VÉRON & CHATELAIN (1973) e HOLDEMAN et al. (1977), por outro lado, SKIRROW & BENJAMIN (1980a) obtiveram resultados variáveis.

Segundo SMIBERT (1974) e HOLDEMAN et al. (1977), todos os C. fetus crescem em meios com 1 % de bile, no entanto o C. fecalis e o grupo C. sputorum apresentam resultados variados.

DILLIELLO et al. (1959), ELAZHARY (1968) e VÉRON & CHATELAIN (1973), tentando diferenciar os campilobacteres produtores de catalase, verificaram que somente as cepas de C. jejuni eram incapazes de crescer em meios cuja concentração de glicose era elevada para 8 %. Entretanto, SKIRROW & BENJAMIN (1980a) comprovaram que esse teste não é exato.

2.2.2.4. Crescimento a várias temperaturas

KING (1957) verificou que todos os campilobacteres cresciam a 37°C, mas os campilobacteres patogênicos intestinais (organismos relacionados aos víbrios) de origem humana e animal apresentavam a propriedade específica de crescimento ótimo à temperatura de 42°C e não cresciam a 25°C. Por outro lado, o V. fetus de origem bovina (C. fetus sub-espécie fetus) e humana (C. fetus sub-espécie intestinalis) cresciam a 25°C mas não a 42°C. Desde então, esses testes têm sido efetuados para caracterizar os diversos campilobacteres. Posteriormente, FLETCHER & PLASTRIDGE (1964b) verificaram que os campilobacteres de origem aviária cresciam a 45°C. FIREHAMMER & BERG (1965) confirmaram as observações de KING, mas relataram a existência de cepas de campilobacteres de origem ovina e bovina que cresciam tanto a 25°C quanto a 42°C. Por isso, SMIBERT (1978), recomenda o teste de crescimento a 25°C como uma característica diferencial mais adequada que o crescimento a 42°C. Do mesmo modo, aquelas cepas que crescem nas duas temperaturas devem ser consideradas como C. fetus sub-espécie intestinalis. Por sua vez, SKIRROW & BENJAMIN (1980a), verificaram que o teste de crescimento a 25°C permitia 100% de separação entre os C. fetus e o grupo coli/

jejuni. Além disso sugeriram que o teste de crescimento a 43°C era mais adequado que a 42°C. De acordo com SMIBERT (1974, 1978), HOLDEMAN et al. (1977) e VÉRON & CHATELAIN (1973), o C. fetus sub-espécie fetus e C. fetus sub-espécie intestinalis, C. sputorum sub-espécie sputorum e algumas cepas de C. sputorum sub-espécie bubulus crescem a 25°C, enquanto as cepas de C. fetus sub-espécie jejuni e C. fecalis não apresentam crescimento a essa temperatura. Por outro lado, as cepas do grupo C. sputorum sub-espécie bubulus, C. fetus sub-espécie jejuni e C. fecalis crescem a temperatura de 42°C enquanto as outras espécies e sub-espécies não crescem a esta temperatura, ressalvadas algumas cepas de C. fetus sub-espécie intestinalis.

2.2.2.5. Sensibilidade a determinados compostos químicos e antimicrobianos

FLORENT (1959) verificou que os campilobacteres do grupo coli jejuni não cresciam bem em meios adicionados de verde brilhante à concentração de 1 : 40.000, mas reduzindo-se esta concentração à metade, era possível obter um certo crescimento. Por sua vez, ELAZHARY (1968) também verificou que os campilobacteres poderiam ser diferenciados através da observação do crescimento em meios com verde brilhante a diferentes concentrações, e neste sentido, as cepas de C. fetus sub-espécie fetus cresciam bem em concentrações elevadas de verde brilhante (1 : 33.000), porém as cepas de C. coli (V. coli) oriundas de diversas fontes, tiveram o crescimento completamente inibido àquela concentração, mas cresciam bem a 1 : 100.000. Por outro lado, as cepas de C. jejuni (V. jejuni) de

origem bovina e ovina não cresciam mesmo a mais baixa concentração do corante. Por este motivo, FLORENT (1959) recomendou a incorporação do verde brilhante à concentração de 1 : 40.000 aos meios empregados para o isolamento do C. fetus sub-espécie fetus (V. fetus) de origem genital, pois permitia o seu isolamento em detrimento dos demais.

Aplicando este teste, VÉRON & CHATELAIN (1973), verificaram que somente as cepas de C. fetus sub-espécie fetus (C. fetus sub-espécie intestinalis) e C. fetus sub-espécie venerealis (C. fetus sub-espécie fetus) eram capazes de crescer à mais alta concentração de verde brilhante (1 : 33.000). Ainda o C. coli podia ser diferenciado do C. jejuni porque somente o primeiro crescia a concentração de 10 ug de verde brilhante por mililitro do meio (1 : 100.000). Entretanto, SKIRROW & BENJAMIN (1980a) verificaram que apenas 352 das 1.120 cepas do grupo coli-jejuni testadas apresentaram resultados satisfatórios de sensibilidade ao verde brilhante.

De acordo com THIBAUALT & FLORENT (apud VÉRON & CHATELAIN, 1973), o C. fetus sub-espécie jejuni (C. coli e C. jejuni) é sensível ao ácido nalidíxico (30 - 40 ug/ml) e relativamente resistente ao cloreto de trifeniltetrazolium (CTT) (1 mg/ml), enquanto que o C. fetus sub-espécie venerealis (C. fetus sub-espécie fetus) e o C. fetus sub-espécie intestinalis (C. fetus sub-espécie fetus) são resistentes ao primeiro composto e sensíveis ao segundo. Para efetuar o teste de resistência ao CTT BUTZLER & SKIRROW (1979), recomendam reduzir a concentração dessa substância de 1 mg para 0,4 mg/ml, porque o C. jejuni cresce melhor a esta concentração. Segundo SKIRROW & BENJAMIN (1980a), o

teste de tolerância ao CTT mostrou-se útil para separar as cepas do grupo coli-jejuni das outras sub-espécies do grupo C. fetus, e até mesmo diferenciar as cepas do grupo coli-jejuni por teste de difusão em disco, pois que o C. coli é bem mais resistente ao CTT que o C. jejuni. LUECHTEFELD & WANG (1982) estudaram 315 cepas de C. fetus sub-espécie jejuni com relação à resistência ao CTT (0,4 mg/ml) e esta característica foi observada em 97 % das cepas de origem humana, 95 % das cepas aviárias e em 100 % das cepas de outros mamíferos. Por outro lado, todas as cepas de C. fetus sub-espécie intestinalis analisadas apresentaram sensibilidade ao CTT.

Quanto à sensibilidade ao ácido nalidíxico, SKIRROW & BENJAMIN (1980a), verificaram que as cepas de C. jejuni e C. coli são sensíveis ao composto, mas deve-se levar em consideração a existência de algumas cepas desse grupo, encontradas em gaivotas, que são resistentes ao ácido nalidíxico. Contrariamente, todas as cepas do grupo C. fetus são resistentes ao ácido nalidíxico (SMIBERT, 1974; HOLDEMAN et al., 1977 e BUTZLER & SKIRROW, 1979).

2.2.2.6. Hidrólise do hipurato

HARVEY (1980) fez um estudo para diferenciar as sub-espécies do grupo C. fetus, empregando o método de hidrólise do hipurato de sódio. Através desse teste o autor observou que somente o C. fetus sub-espécie jejuni era capaz de hidrolisar o hipurato. SKIRROW & BENJAMIN (1980b) verificaram que a atividade da hipuricase era característica exclusiva dos dois biotipos de C. jejuni, o que permi

tia diferenciá-los do C. coli e C. fetus. Por sua vez, LUECHTEFELD & WANG (1982) estudando 315 cepas de C. fetus sub-espécie jejuni encontraram atividade de hipuricase em 99 % das 155 isoladas de seres humanos, 75 % das 60 isoladas de aves, 100 % de 41 cepas bovinas e caninas, 84 % de 31 isoladas de mamíferos de zoológicos e em nenhuma das 28 cepas isoladas de suínos. Por outro lado, todas as 18 cepas de C. fetus sub-espécie intestinalis estudadas pelo mesmo autor não hidrolisaram o hipurato.

Segundo LEAPER & OWEN (1981), os testes mais importantes usados na identificação das várias espécies de campilobacteres produtoras de catalase foram o crescimento a 25° e 42°C, produção de sulfeto de hidrogênio, tolerância ao ácido nalidíxico e ao cloreto de trifeniltetrazolium e hidrólise do hipurato. Ainda segundo os pesquisadores, a única forma de diferenciar o C. coli do C. jejuni era a execução do último teste.

2.2.3. Métodos para isolamento de C. fetus sub-espécie jejuni

Desde as primeiras tentativas para o isolamento de C. fetus de animais, se verificou a dificuldade de crescimento e desenvolvimento do microrganismo nas condições de rotina dos laboratórios (SMITH, 1918). Esta dificuldade deve-se sobretudo, às complexas e exigências culturais desses microrganismos, particularmente quanto à nutrição, atmosfera e temperatura de incubação (SMIBERT, 1978). Além disso, os campilobacteres apresentam crescimento lento quando comparado a outros microrganismos contaminantes, tais como enterobactérias e pseudomonas, usualmente presentes nos materiais de aná

lise (SMIBERT, 1965; SMITH & MULDOON, 1974; TANNER & BULLIN, 1977; BUTZLER et al., 1973; e SMELTZER, 1981). Em decorrência, diferentes métodos têm sido desenvolvidos com o objetivo de fornecer as condições necessárias para o isolamento e desenvolvimento do C. fetus sub-espécie jejuni. Dentre estes incluem-se o uso de meios seletivos, redução da concentração de oxigênio do ar para 5 a 6 %, aumento da concentração de anidrido carbônico para cerca de 10 % e incubação à temperatura de 42^oC (SMIBERT, 1978; SKIRROW, 1977; BUTZLER et al., 1973; KIGGINS & PLASTRIDGE, 1956; KING, 1957).

A fim de evitar os microrganismos contaminantes, DEKEYSER et al. (1972) aplicaram o procedimento de PLUMER, DUVALL & SHEPLER (1962) e SHEPLER, PLUMER & FABER (1963), o qual envolve a filtração diferencial das amostras em filtros de membranas com poros de 0,65 µm de diâmetro e posterior inoculação do filtrado em ágar sangue com antibióticos. Esta técnica baseia-se no princípio de que os campilobacteres por serem delgados passam através dos poros, em detrimento da maioria dos contaminantes que são retidos. Este procedimento, entretanto, é muito laborioso para uso em análise de rotina e é menos sensível que os métodos de inoculação direta em meios sólidos seletivos (BUTZLER & SKIRROW, 1979), provavelmente devido à retenção dos campilobacteres nos filtros (WANG, BLASER & CRAVENS, 1978; GRANT, RICHARDSON & BOKKENHEUSER, 1980). WANG et al. (1978) recomendam esta técnica para análise de fezes de animais, devido à presença de Proteus que crescem mesmo em meios com antibióticos.

2.2.3.1. Tratamento das amostras

As amostras de fezes, intestinos ou alimentos, coletadas com zaragatoas, são geralmente transportadas e mantidas a 4°C em tubos de rosca contendo os mais diferentes meios, tais como tioglicolato (BLASER et al., 1979b), meio para brucéla (HOLDEMAN et al., 1977), meio peptonado com extrato de levedura e magnésio (FIREHAMMER & MYERS 1981), meio Albimi para brucela (STERN, 1981b), meio enriquecido para brucela (WANG et al., 1980), meio de transporte de Cary & Blair (LUECHTEFELD et al., 1981b). A estes meios deve-se adicionar 0,16 % de ágar, quantidade que permite a oxigenação do meio em torno de 6 % (SMIBERT, 1974) e usualmente os antibióticos cloridrato de vancomicina, sulfato de polimixina-B, lactato de trimetoprim, anfotericina-B e cefalotina (BLASER et al., 1979a). Desse modo, os meios semi-sólidos são seletivos pois fornecem atmosfera micro-aeróbia, eliminando os microrganismos anaeróbios estritos da porção superior oxigenada, assim como selecionam os microrganismos móveis como os campilobacteres que se deslocam para aquela porção. A adição de antibióticos e a incubação a 42°C torna os meios ainda mais seletivos. Podem ainda ser utilizados o caldo nutriente com sangue e antibióticos (ROBINSON et al., 1979), água peptonada alcalina (TANNER & BULLIN, 1977; STICHT-GROH, 1982), salina glicerol (KARALI & FLEMING, 1979b) ou salina com tampão de fosfato (SMELTZER, 1981).

As amostras sólidas de alimentos ou alças intestinais podem ser acondicionadas em caldo nutriente (SMITH & MULDOON, 1974), água peptonada 0,1 % (NORBERG, 1981); salina fisiológica ou água

destilada estéril (AL-MASHAT & TAYLOR, 1980a), caldo de infusão de cérebro e coração (GRANT et al., 1980). Segundo GILL & HARRIS (1982), quando se usam zaragatoas para amostragem, estas podem ser acondicionadas em água peptonada 0,1 %.

O período para análise não deve ser longo, pois os microrganismos psicrotróficos contaminantes podem superar rapidamente em número os campilobacteres, particularmente em amostras que presumivelmente contenham o microrganismo em baixos níveis ou que tenham sofrido injúrias. Isto pode até mesmo ocorrer com alimentos em condições normais de manuseio e manutenção, devido à toxicidade do oxigênio atmosférico e incapacidade do organismo multiplicar-se a baixas temperaturas.*

2.2.3.2. Meios para recuperação e isolamento

As amostras de alimentos podem ser inoculadas em caldo de enriquecimento e/ou plaqueadas diretamente em meios sólidos seletivos (PARK et al., 1981). Para amostras frescas, seja de fezes, conteúdo de pessoas e animais sintomáticos, o plaqueamento direto é preferido, devido à presença do microrganismo em grande número e por permitir abreviar o diagnóstico.

BLASER et al. (1979a) recomendam o plaqueamento direto em meios seletivos e a inoculação das amostras de fezes em meio semi-sólido de enriquecimento, constituído de caldo de tioglicolato com antibióticos, e refrigeração por 8 horas antes de proceder à inoculação em meios sólidos seletivos. Entretanto, segundo DOYLE & ROMAN (1982c), este procedimento não é adequado para o isolamento

* Manuscrito de PARK et al., a publicar.

de campilobacteres em baixos números, porque estes microrganismos não crescem à temperatura de refrigeração, morrendo progressivamente, ainda que lentamente.

TANNER & BULLIN (1977) verificaram que a manutenção das amostras em água peptonada alcalina (pH= 8,4) e incubação a 43°C em atmosfera micro-aeróbia constitui um método satisfatório de enriquecimento para campilobacteres, permitindo o crescimento e multiplicação de pequenos inóculos (1 a 10 organismos), mesmo em presença de números elevados de Escherichia coli e Streptococcus faecalis. Além disso este método permitiu isolar o Campylobacter de duas amostras de fezes que haviam dado resultados negativos pelo plaqueamento direto. Por outro lado, WANG, BLASER & CRAVENS (1978), relataram que este meio é útil para recuperação do C. jejuni de suspensoes fecais inoculadas com o microrganismo e incubadas a 42°C por período de tempo não superior a 8 horas, visto que incubações mais prolongadas resultam em crescimento exagerado de outros membros da flora intestinal. Contudo, estes pesquisadores observaram que este método de enriquecimento é menos efetivo para o isolamento do C. jejuni de amostras de fezes de pacientes do que o procedimento de plaqueamento direto em meio seletivo.

DOYLE & ROMAN (1982c) acreditam que a ineficácia do enriquecimento em água peptonada alcalina para isolamento seja devido ao fato de que este microrganismo apresenta uma baixa velocidade de crescimento, mesmo sob condições aparentemente ótimas, que permitem a sobrepujância do Campylobacter pelos microrganismos da flora normal.

LANDER & GILL (1980) desenvolveram um meio de enriquecimento

seletivo constituído de caldo de carne de vitela ao qual acrescentam 7 % de sangue lisado de cavalo, 1 % de carvão vegetal para bacteriologia e os antibióticos vancomicina (40 µg/ml), trimetoprim (20 µg/ml), polimixina-B (10 UI/ml), cicloheximida (100 µg/ml), para isolamento do C. coli-jejuni de fezes de vacas infectadas experimentalmente com o microrganismo, por via intramamária. Após a inoculação, o meio de enriquecimento foi incubado a 37°C por 48 horas aerobiamente e então repicado em ágar seletivo de Skirrow suplementado com o antibiótico actidiona (100 µg/ml), assim como em ágar sangue comum. De acordo com DOYLE & ROMAN (1982c), o meio de enriquecimento anteriormente mencionado mostrou-se inibitório para algumas cepas de C. jejuni, provavelmente devido à presença dos antibióticos em elevadas concentrações.

SMELTZER (1981) desenvolveu um meio de enriquecimento líquido constituído de 4 g de extrato de levedura, 1 g de piruvato de sódio, 1 g de metabissulfito de sódio e 1 g de sulfato ferroso, para cada litro de infusão de cérebro e coração, para o isolamento de C. jejuni de carcaças de frangos. As amostras eram obtidas por lavagem superficial das carcaças. Parte do líquido de enxaguadura das mesmas era plaqueado diretamente em ágar para campilobacteres e o restante era inoculado no meio líquido de enriquecimento. O procedimento de enriquecimento consistia em incubar as amostras a 37°C por 3 a 4 horas, adição dos antibióticos de SKIRROW (1977) suplementados com cefalotina (15 µg/ml) e incubação a 43°C por mais 48 horas. Os repiques eram feitos após 24, 48 e 72 horas, por plaqueamento direto em ágar seletivo e indireto, após filtração de 4 gotas em membranas com poros de 0,65 µm. Através deste procedimento

de enriquecimento e filtração em membrana, o autor conseguiu isolar o C. jejuni de 5 amostras, as quais tinham dado resultados negativos pelo plaqueamento direto.

Estudando a taxa de recuperação de C. jejuni inoculado experimentalmente em carne moída, tendo sido enriquecido em caldo de tioglicolato com 7 % de sangue lisado de cavalo, 40 µg/ml de vancomicina, 30 µg/ml de trimetoprim, 10 UI/ml de polimixina-B e 100 µg/ml de cicloheximida, e incubado a 37°C por 24 horas em atmosfera micro-aeróbia, OOSTEROM, VEREIJKEN & ENGELS (1981), verificaram que este meio era capaz de recuperar de 100 a 1000 células do microrganismo por grama de carne. Ainda, os pesquisadores tornaram este meio mais sensível pela incorporação de 1,5 % de bile bovina, permitindo recuperação de até 3 a 10 células de C. jejuni por grama de carne.

PARK et al. (1981) desenvolveram um sistema de recuperação para amostras de frangos, as quais eram filtradas em camada dupla de algodão e centrifugadas a 16.300 x G por 15 min. O sedimento era suspenso em caldo para brucela e transferido para caldo de enriquecimento com o mesmo meio adicionado de 8 µg de vancomicina, 4 µg de trimetoprim e 8 µg de sulfato de polimixina-B, para cada ml do meio. A incubação era efetuada a 42°C sob um fluxo constante de uma mistura gasosa de 85 % de nitrogênio, 10 % de anidrido carbônico e 5 % de oxigênio, a uma velocidade de 5 a 7 ml por minuto (ou em condições estáticas de micro-aerobiose), por um período de três dias, ao fim do qual a cultura era filtrada em filtros de membranas com poros de 0,65 µm de diâmetro. As diluições do filtrado eram plaqueadas em meios seletivos. Através deste pro

cedimento, os autores verificaram que era possível recuperar acima de 0,2 células de campilobacter na presença de 10^4 a 10^6 organismos contaminantes por grama, além de ser duas vezes mais eficiente para o isolamento do C. jejuni de carcaças de frangos do que o plaqueamento seletivo direto.

DOYLE & ROMAN (1982c) desenvolveram um procedimento de recuperação seletiva de pequenos números de campilobacteres em leite cru, pele de frango e hamburguer, que apresentavam contagem aeróbia em placas de 10^5 a 10^9 bactérias por grama. O meio era constituído de caldo para brucela com 7% de sangue lisado de cavalo, 0,35 de succinato de sódio, 0,01% de hidrocloreto de cisteína, 15 ug/ml de trimetoprim, 20 UI/ml de polimixina-B e 50 ug / ml de cicloheximida. Após incorporação ao meio de cultura de 10 ou 25 g de alimento inoculado, a incubação era feita com agitação sob condições micro-aeróbia a 42°C por 16 a 18 horas, quando se procedia ao plaqueamento em meio sólido de Blaser e colaboradores. O procedimento mostrou-se efetivo para recuperar até 0,1 célula de Campylobacter por grama de alimento. Das 50 cepas de campilobacteres inoculadas experimentalmente, todas foram recuperadas de leite cru e hamburguer a um nível de 1 a 4 células por grama. No entanto, somente 41 e 40 cepas foram recuperadas de hamburgueres e leite cru, respectivamente, quando o inóculo continha 0,1 a 0,4 célula/g. Embora este procedimento tenha sido mais rápido e direto que os mencionados anteriormente, ele foi o menos efetivo para recuperação de Campylobacter da pele de frangos, pois das 50 cepas estudadas, 7 e 26 não foram recuperadas quando o inóculo continha de 1 a 4 e 0,1 a 0,4 células/g, respectivamente.

Os meios sólidos seletivos empregados para o isolamento de C. fetus sub-espécie jejuni são basicamente de dois tipos. O meio de Skirrow é constituído de ágar nutriente especial (base para ágar sangue nº 2 da OXOID) com 5 a 7 % de sangue lisado de cavalo, 10 µg/ml de cloridrato de vancomicina, 2,5 UI/ml de sulfato de polimixina-B e 5 µg/ml de lactato de trimetoprim. O outro meio existente é o de Butzler, constituído de ágar de tioglicolato com 15 % de sangue de carneiro, 25 UI/ml de bacitracina, 5 µg/ml de novobiocina, 50 µg/ml de actidiona, 10 unidades/ml de colistina e 15 µg/ml de cefalotina. De acordo com BUTZLER & SKIRROW (1979), o primeiro meio tem uma fórmula mais simples e é menos seletivo que o segundo meio. Se for empregado um meio básico diferente, por exemplo o ágar Colúmbia, na preparação do primeiro meio, deve-se aumentar a concentração de polimixina. O uso de sangue lisado de cavalo é essencial para assegurar a neutralização de antagonistas à trimetoprim, que de outro modo permitiria o crescimento de Proteus sp.

O meio de Skirrow foi posteriormente modificado por WANG et al. (1978) pela adição de anfotericina-B (2 µg/ml) e por BLASER et al. (1979a), incorporando ainda 15 µg/ml de cefalotina, tornando-o efetivamente mais inibitório para o crescimento de organismos da flora entérica normal sem afetar o C. fetus sub-espécie jejuni. KARMALI & FLEMING (1979a) verificaram que o meio de Skirrow contendo 5 µg/ml (50 UI/ml) de polimixina-B, tendo como base o ágar Colúmbia, suprimia melhor a flora normal resistente, permitindo melhor leitura. PATTON et al. (1981) modificaram o meio de Butzler pelo aumento da concentração de colistina de 10 para

20 unidades/ml, conseguindo reduzir o número de coliformes competidores, sem afetar o crescimento do C. fetus sub-espécie jejuni. O meio preparado com ágar brucela e com os antibióticos de Skirrow, modificado por BLASER et al. (1979a), tem sido usado com sucesso em análises de fezes humanas.

BORDER, FIREHAMMER & MYERS (1974) substituíram com eficiência o sangue por hematina em concentração de 0,002 % no meio de ágar brucela.

De acordo com GEORGE et al. (1978), a adição, ao ágar brucela, dos compostos sulfato ferroso, metabissulfito de sódio e piruvato de sódio, na concentração de 0,025 %, melhorava consideravelmente o crescimento do C. fetus, provavelmente por proteger as células da toxicidade do oxigênio, pois com este meio era possível cultivar as células deste microrganismo, mesmo em teores elevados de oxigênio.

Por sua vez, RAZI & PARK (1979) verificaram que a incorporação conjunta dos agentes seletivos de Skirrow e 0,001 % de hematina ao ágar nutriente facilitava o isolamento de Campylobacter, mesmo em se tratando de inóculos pequenos, além do meio ser mais simples e mais barato que os mais comumente empregados.

GILCHRIST, GREWELL & WASHINGTON II (1981) verificaram que o método de plaqueamento direto utilizando meios sólidos com suplementos de GEORGE et al. (1978), oferece várias vantagens sobre o método de enriquecimento de BLASER et al. (1979a), para o isolamento de C. fetus sub-espécie jejuni de amostras clínicas. Dentre elas, permite o diagnóstico em 24 horas, reduz os custos e a necessidade de novos testes adicionais. Naquele mesmo estudo, os auto

res verificaram que o meio de Thayer-Martin e modificações são inadequados para o isolamento primário de muitas cepas de C. fetus sub-espécie jejuni.

MEHLMAN & ROMERO (1982), estudando os principais requisitos de várias cepas de Campylobacter sp., observaram que as concentrações, fontes de nitrogênio orgânico e fatores de crescimento são críticos. Para o crescimento de pequenos inóculos é necessário a presença de extratos de carne e de levedura, aminoácidos de caseína e ágar. A faixa ótima de pH situa-se entre 7,0 e 7,5, segundo os pesquisadores. Além disso foi observado que as culturas apresentavam sensibilidade aos agentes tenso-ativos, como sulfato-lauril e sais biliares nº 3, em concentrações comumente empregadas para o enriquecimento de bactérias entéricas. Por outro lado, as culturas toleram 0,7 % de cloreto de sódio em adição aos sais presentes nos constituintes orgânicos.

Entre os principais meios sólidos seletivos empregados, o de Butzler e aquele modificado por PATTON et al. (1981), são mais inibitórios para o Campylobacter e para a flora competitiva, do que os meios de Skirrow e o modificado por BLASER et al. (1979a). Ainda, a capacidade de recuperação depende tanto da natureza das cepas de campilobacteres como do número de bactérias presentes nos alimentos.* Para análise de materiais clínicos, o melhor seria utilizar concomitante uma combinação conjunta dos principais meios (PATTON et al., 1981), assim como procedimentos de enriquecimento (CHAN & MAKENZIE, 1982; STICHT-GROH, 1982; PARK et al., 1981).

SMELTZER (1981), na Austrália, empregou com sucesso um meio sólido seletivo para isolamento de C. jejuni de carcaças frescas

* Manuscrito de PARK et al., a publicar.

de frangos, constituído de ágar de Mueller-Hinton com os ingredientes de GEORGE et al. (1978), os antibióticos de Skirrow e 15 ug/ml de cefalotina. Entretanto, 5 culturas adicionais somente foram positivas após enriquecimento e filtração. Do mesmo modo, PARK et al. (1981) empregaram o meio de Skirrow modificado pelo aumento de 10 vezes a concentração de polimixina, mas o isolamento direto resultou apenas em 32 % de casos positivos, e em 62 % após o enriquecimento.

Através de plaqueamento direto em meio de Blaser, cujo ágar triptose é utilizado como base, e incubação micro-aeróbia a 42°C por 48 horas, LUECHTEFELD & WANG (1981) conseguiram isolar o C. fetus sub-espécie jejuni de amostras do trato intestinal, carcaças frescas de perus e também de superfícies do abatedouro.

STERN (1981a) empregou um meio constituído de ágar com soja tríptica com 5 % de sangue desfibrinado de cavalo e os antibióticos de Skirrow com 15 ug/ml de cefalotina, para analisar carne bovina inoculada experimentalmente, obtendo uma recuperação de 100% quando o inóculo era de 32 células de Campylobacter/cm² de superfície estudada e de 40 %, quando o mesmo era de 0,3 a 3,2 células por cm². Em outro estudo, STERN (1981b) verificou que este método permitia isolar o C. fetus sub-espécie jejuni de fezes e carcaças frescas de ovinos, suínos e bovinos.

GILL & HARRIS (1982) empregaram o meio de BLASER et al. (1979a) juntamente com os suplementos de GEORGE et al. (1978) e os antibióticos recomendados por Butzler ou Skirrow, para o isolamento de C. fetus sub-espécie jejuni de fezes e carcaças de bezerras e borregos, assim como de superfícies utilizadas em mata

douros. Os autores verificaram que estes meios são úteis e que as colônias do microrganismo apareciam mais rapidamente (48 horas) no meio suplementado com os antibióticos de Skirrow do que naqueles com os antibióticos de Butzler (3 - 4 dias). Também, a técnica de amostragem com zaragatoas (umedecidas em peptona 0,1 % ou secas) apresentou uma taxa de recuperação de aproximadamente 1 % para superfícies de carne. Para superfície de vidro, a taxa de recuperação foi de 10 %.

CHRISTOPHER, SMITH & VANDERZANT (1982b) desenvolveram com sucesso um procedimento para determinar o número mais provável (NMP) de C. fetus sub-espécie jejuni em miúdos frescos comestíveis de frangos, que consistia em cultivar as amostras em caldo para brucela com 0,15 % de ágar, 0,05 % de piruvato de sódio e os antibióticos usados por BLASER et al. (1979a). Os tubos inoculados eram mantidos a 2°C por 12 horas e então incubados a 42°C por 48 horas em atmosfera micro-aeróbia. Findo este período, o plaqueamento era feito em ágar brucela suplementado com 10 % de sangue desfibrinado de cavalo e com os mesmos antibióticos. A incubação era feita por 48 horas em atmosfera adequada.

NORBERG (1981) detectou a presença de C. fetus sub-espécie jejuni em carcaças congeladas de frangos, através da filtração das amostras em filtros de membrana com poros de 0,45 µm e inoculação das membranas no meio de Skirrow. A incubação era feita em duas jarras de anaerobiose sem o catalisador, sendo que uma era incubada a 42°C por 48 horas e a outra a 25°C por 5 dias.

2.2.3.3. Temperatura e pH

DOYLE & ROMAN (1981) estudando o efeito da temperatura e pH, em caldo para brucela, sobre o crescimento e sobrevivência do C. fetus sub-espécie jejuni, verificaram que o crescimento não o corria à temperatura de 30°C ou abaixo desta e à temperatura de 47°C ou acima desta. Por outro lado, a faixa de temperatura ótima de crescimento encontrava-se entre 42 e 45°C, e o pH ótimo entre 6,5 e 7,5, embora todas as cepas analisadas crescessem bem em faixas de pH de 5,5 a 8,0.

BUTZLER & SKIRROW (1979) relataram que a temperatura de incubação a 37°C é satisfatória para o isolamento de C. coli -jejuni, mas a seletividade pode ser aumentada e os resultados podem ser obtidos mais rapidamente pela incubação a 42-43°C, pois exclui os organismos do grupo C. fetus e o crescimento torna-se visível entre 12 a 48 horas, a depender do número de organismos presentes na amostra. Entretanto, as placas devem ser incubadas por um período mínimo de 72 horas antes de serem descartadas (PATTON et al., 1981). Para isolamento de outras espécies do gênero Campylobacter é necessário incubar à temperatura de 37°C (KING, 1962; ULLMANN, 1979; HOLDEMAN et al., 1977 e MORRIS & PARK, 1971).

2.2.3.4. Atmosfera micro-aeróbia

A atmosfera micro-aeróbia requerida para o isolamento e crescimento de C. fetus sub-espécie jejuni pode ser conseguida por di

versos procedimentos. O mais simples consiste em adicionar 0,12 a 0,20 % de ágar aos meios líquidos e incubar sob condições aeróbias. O crescimento nestas condições ocorre somente na porção superior, isto é, 2 a 3 mm abaixo da superfície do meio (SMIBERT, 1974).

A atmosfera micro-aeróbia ótima para crescimento de C. fetus pode ser obtida através da evacuação do ar de uma jarra para anaerobiose e substituí-lo por uma mistura gasosa de 5 % de oxigênio, 10 % de anidrido carbônico e 85 % de nitrogênio (KIGGINS & PLASTRIDGE; 1956). Alternativamente, pode-se evacuar 2/3 do ar e ajustar a pressão com uma mistura gasosa de 95 a 85 % de nitrogênio e 5 a 15 % de anidrido carbônico (MORRIS & PARK, 1971; HOLDEMAN et al., 1977 e BUTZLER & SKIRROW, 1979).

Esta atmosfera pode também ser conseguida por meio de reações químicas, através da utilização de um envelope de Gás-Pak ou colocando um tubo com 3 gramas de NaHCO_3 em uma jarra para anaerobiose sem catalisador e adicionando ao tubo 3 ml de HCl a 0,2 N. Evacua-se então 3/4 do ar da jarra e fecha-se.* Segundo KIGGINS & PLASTRIDGE (1956) não é obrigatoriamente necessário ajustar a pressão com nitrogênio ou hidrogênio.

Um método simples consiste em colocar uma ou mais velas acesas num recipiente que se feche hermeticamente. De acordo com LUECHTEFELD et al. (1982), este método reduz o teor de oxigênio do ar de 21 % para 17% e gera 3 % de anidrido carbônico, mas é recomendável apenas quando se usa uma temperatura de incubação de 42°C e em condições onde não haja possibilidade de fornecer uma atmosfera ótima. GEORGE et al. (1978) relataram que a incorporação

* Manuscrito de PARK et al., a publicar.

(ao meio de ágar brucela) de sulfato ferroso, metabissulfito de sódio e piruvato de sódio, na concentração de 0,025 % de cada substância, permitiu uma melhor recuperação de C. fetus, especialmente quando se usa o método da vela. Por outro lado, este método somente é útil para propagação de culturas puras ou para isolamento de Campylobacter de amostras contendo acima de 10^6 células do organismo por grama, e deste modo não é recomendável o seu uso para o isolamento de microrganismos de alimentos.*

MAGALHÃES, ANDRADE & SILVA (1982) aplicando o método da lâ de aço para isolamento de C. fetus sub-espécie jejuni de amostras de fezes humanas, verificaram que é mais econômico e de mesma eficiência que o processo Gás-Pak sem o catalisador. Por aquele método, consegue-se a atmosfera micro-aeróbia embebendo-se pedaços de lâ de aço (4-5 g) em placa de Petri contendo uma solução acidificada de sulfato de cobre (10 ml). O líquido é removido e a placa invertida é colocada num recipiente de 1,5 l de capacidade contendo 1/2 tablete de Alka-Seltzer.

KARMALI & FLEMING (1979c) aplicaram com sucesso o princípio de FORTNER para isolamento de C. fetus sub-espécie jejuni de amostras clínicas. Este método consiste na utilização de um microrganismo anaeróbio facultativo (Proteus rettgeri) de crescimento rápido, para reduzir a concentração de oxigênio e aumentar a tensão de anidrido carbônico da atmosfera de incubação, através do metabolismo em um sistema fechado, que permite o crescimento de organismos sensíveis ao oxigênio, como os campilobacteres. Este método foi igualmente eficaz ao método da substituição de 2/3 do ar da jarra anaeróbia por anidrido carbônico.

* Manuscrito de PARK et al., a publicar.

PATTON et al. (1981) obtiveram uma atmosfera micro-aeróbia em jarras para anaerobiose sem catalisador, de aproximadamente 5% de oxigênio e 8 % de anidrido carbônico, através da evacuação do ar a 15 polegadas de mercúrio e substituição por uma mistura gasosa de 10 % de CO₂, 10 % de H₂ e 80 % de N₂. O processo era repetido duas vezes.

2.2.4. Capacidade de sobrevivência do C. fetus sub-espécie jejuni

Muito embora o C. fetus sub-espécie jejuni já tenha sido implicado como agente de toxinfecção alimentar, pouco se sabe sobre sua capacidade de sobrevivência em diferentes ambientes e condições fisiológicas, bem como em relação à composição, processamento e estocagem de alimentos (DOYLE, 1981).

Desde 1919, que SMITH & TAYLOR verificaram que o C. fetus sub-espécie fetus era bastante sensível à dessecação e ao calor, morrendo 3 horas após exposição à temperatura ambiente e 10 minutos após exposição a 55°C.

Em 1974, SMITH & MULDOON relataram que o C. fetus sub-espécie jejuni é capaz de sobreviver em superfícies de carne de frango cruas mantidas em refrigeração (3°C) e congelamento (-23,5°C), por períodos de tempo correspondentes à comercialização das aves, 5 e 20 dias respectivamente.

Segundo BLASER et al. (1980a), o C. fetus sub-espécie jejuni não se multiplica quando inoculado no leite, mas pode permanecer viável por várias semanas e mais de 24 horas se mantidas em temperaturas de 4 e 25°C, respectivamente. Em condições normais,

WATERMAN (apud ROBINSON & JONES, 1981) obteve resultados idênticos. DOYLE & ROMAN (1981), estudando as taxas de inativação do C. fetus sub-espécie jejuni em creme de leite, aquecido a 48, 50, 53 e 55°C, encontraram valores D entre 7,2 e 12,8 minutos para a temperatura de 48°C e de 0,74 a 1 minuto a 55°C. Os autores concluíram que as temperaturas e tempos usados na pasteurização do leite seriam suficientes para eliminação de números elevados de Campylobacter, porventura presentes no leite. Neste mesmo sentido CHRISTOPHER, SMITH & VANDERZANT (1982a) verificaram que o C. fetus sub-espécie jejuni e o C. fetus sub-espécie intestinalis não sobrevivem ao aquecimento de 60°C por 1 minuto, em creme de leite. Os valores de D para estas duas sub-espécies a 50°C situa-se entre 1,3 a 4,5 e 1 a 3,7, respectivamente. Por outro lado, os autores verificaram um decréscimo das contagens de C. fetus quando em creme de leite estocado às temperaturas de - 20, 1, 10, 20, 30 e 40°C. Entretanto, a faixa de temperatura entre 1 e 10°C foi a que permitiu melhor sobrevivência do microrganismo. Resultados semelhantes foram obtidos por BLASER et al. (1980a).

Com relação ao pH, BLASER et al. (1980a) verificaram "in vitro" que a sobrevivência do C. fetus sub-espécie jejuni em soluções de HCl era significativamente afetada a valores de pH abaixo de 3,0 e não era afetada quando os valores de pH eram superiores a 3,6. Os relatos de DOYLE & ROMAN (1981) sobre crescimento e sobrevivência do C. fetus sub-espécie jejuni em meio para brucela indicaram que as taxas de morte celular entre pH 3 e 4,5, dependiam da temperatura, pois nesta faixa de pH as células do microrganismo morriam mais rapidamente à temperatura ótima de crescimento

(24°C), menos rapidamente a temperatura ambiente (25°C) e menos ainda sob temperatura de refrigeração. CHRISTOPHER et al. (1982a) estudaram a influência da variação do pH em meio para brucella incubando a 37°C, verificando que a pH 5,0 nenhum sobrevivente de C. fetus era detectado após 24 horas, e a pH 9,0 as contagens de C. fetus sub-espécie jejuni decresceram rapidamente, enquanto as de C. fetus sub-espécie intestinalis aumentaram ligeiramente.

BLASER et al. (1980a) também estudaram a sobrevivência do C. fetus sub-espécie jejuni em diferentes produtos biológicos a várias temperaturas, verificando que os microrganismos apresentavam viabilidade máxima quando mantidos a 4°C, 3 semanas em leite e em fezes, 4 semanas em água e 5 semanas em urina. Na bile os microrganismos multiplicavam-se a 37°C e sobreviviam por 2 meses. A sobrevivência dos microrganismos nos produtos foi melhor a 4°C do que a 25°C. Os autores chegaram a conclusão que a contaminação daqueles produtos pelo C. fetus sub-espécie jejuni poderia representar um importante papel na disseminação do microrganismo ou como reservatórios ambientais.

LUECHTEFELD, WANG, BLASER & RELLER (apud BLASER, 1982) analisaram a sobrevivência do C. fetus sub-espécie jejuni em amostras de cecum de perus infectados, verificando que o microrganismo sobrevivia em média por 9 e 4 dias quando mantidos a 4 e 25°C, respectivamente. Entretanto, somente 20 % das amostras positivas, congeladas a -20 ou -70°C, permitiram a recuperação do microrganismo. Por outro lado, nenhum sobrevivente foi encontrado em culturas do microrganismo seco e mantido em tiras de papel de filtro por 1,5 horas.

WANG (apud LUECHTEFELD & WANG, 1981) verificou que 0,625 ppm

de cloretos aplicados a uma suspensão de 10^7 células de C. fetus sub-espécie jejuni, por ml, matava todas as células do microrganismo em 4 horas. Surpreendentemente, LUECHTEFELD & WANG (1981) relataram que 34 % de carcaças de perus contaminadas com C. fetus sub-espécie jejuni mantidas em tanques de resfriamento com água clorada na concentração de 20 a 50 e 50 a 340 ppm, durante 24 horas, não reduzia o número de carcaças positivas. Entretanto, CHRISTOPHER et al. (1982b) ao analisar 50 amostras de fígado e moela de frangos e perus obtidas após lavagem em água clorada (50-100 ppm), constataram que nenhuma amostra apresentou o microrganismo.

CHRISTOPHER et al. (1982a), verificaram que inoculando C. fetus sub-espécie jejuni e C. fetus sub-espécie intestinalis em pedaços regulares de carne bovina a um nível de 10^6 e 10^7 cél./g, quando o centro da carne atingia 57 ou 55°C, os microrganismos eram eliminados, entretanto, à temperatura interna de 50°C e 53°C, os pesquisadores verificaram a presença de sobreviventes de C. fetus na carne. Por outro lado, a estocagem de carne moída contendo C. fetus às temperaturas de -20, 1, 10, 20, 30 ou 40°C, resultou em decréscimo das contagens dos microrganismos em todas as temperaturas, sendo que a maior sobrevivência foi observada nas temperaturas de 1 e 10°C.

BLANKENSHIP & CRAVEN (1981), por sua vez, verificaram que os valores "D" para as cepas de C. fetus sub-espécie jejuni quando aquecidas a 49-57°C e inoculadas em carne de frango moída autoclavada, foram maiores do que em água peptonada a 1 %. Os pesquisadores também verificaram que os procedimentos comuns de aquecimento

que destroem Salmonella deveriam destruir C. fetus sub-espécie jejuni. Com relação à sobrevivência e crescimento dos microrganismos na superfície da carne de frango, mantidos a diferentes temperaturas por 17 dias, os autores obtiveram os seguintes resultados: crescimento até 4 dias, seguido de declínio mínimo constante a 37°C, declínio máximo constante a 23°C e declínio moderado constante a 4°C. Os autores ainda estudaram a influência da variação da atmosfera, verificando que o crescimento do microrganismo em carne de frango a 37°C ocorria rapidamente à atmosfera de 5 % de oxigênio e paralelamente foi observado um declínio acentuado à atmosfera ambiente.

Segundo DOYLE & ROMAN (1982b), as cepas de C. fetus sub-espécie jejuni são, geralmente, sensíveis à secagem e à estocagem à temperatura ambiente, mas podem sobreviver por vários dias em superfícies se o ambiente for mantido à temperatura de refrigeração (4°C) e baixa umidade (menor que 14 %).

2.2.5. Manutenção e preservação das culturas

Os campilobacteres não sobrevivem por muito tempo nos meios bacteriológicos comumente empregados para manutenção, sejam sólidos, semi-sólidos ou líquidos. As células destes microrganismos geralmente tornam-se cocóides e inviáveis com o envelhecimento da cultura e não são raros os relatos da perda destes microrganismos em meios artificiais de laboratório, seja por envelhecimento ou manuseio excessivo das culturas (BUTZLER et al., 1973; SMITH & TAYLOR, 1919; SCHNEIDER & MORSE, 1955; MORRIS & PARK, 1971; WANG

et al., 1980; GRANT et al., 1980 e SMIBERT, 1978).

Na tentativa de se obterem procedimentos adequados para preservação de campilobacteres, inclusive tolerantes ao calor, SCHNEIDER & MORSE (1955) estudaram o emprego do meio Albimi para brucela, com 0,1 % de ágar a várias temperaturas. Os autores concluíram que as culturas mantidas a 1°C eram instáveis. Por outro lado, mantinham-se viáveis por quatro semanas à temperatura ambiente (21°C).

MORRIS & PARK (1971) recomendam manter as culturas em meio de tioglicolato de Brewer com 0,4 % de ágar e em caldo de carne cozida à temperatura ambiente, após crescimento máximo a 37°C por 3 dias. As transferências devem ser efetuadas mensalmente e não é recomendável manipular muito as culturas.

PARK (1976) preservou os campilobacteres (Vibrio fetus) por mais de 2 anos em caldo tripticase com 15 % de glicerol, estocando as culturas a - 50°C.

GARVIE (1967) recomenda preservar os campilobacteres por liofilização, utilizando culturas crescidas em ágar sangue-tioglicolato. Entretanto, devem-se tomar cuidados especiais para recuperação das culturas liofilizadas.

WANG et al. (1980) sugerem o uso do meio para brucela com 0,5% de ágar e 10 % de sangue desfibrinado de carneiro para preservação ou transporte de culturas puras de C. fetus sub-espécie jejuni, visto que permite a sobrevivência do microrganismo por períodos de tempo superiores a 27 dias quando estocado à temperatura ambiente (22 a 25°C).

RAZI & PARK (1979) conseguiram preservar culturas puras de

Campylobacter sp. em meio semi-sólido reforçado para clostrídios adicionado de NaCl 0,5 %, aspartato de potássio 0,2 % e extrato de levedura 0,3 %. A incubação era efetuada aerobiamente e os re piques após 10 semanas.

GRANT et al. (1980), estudando a sobrevivência de 18 cepas de C. fetus sub-espécie jejuni, verificaram que os melhores resultados foram obtidos em caldo de infusão de cérebro e coração, su plementado com sangue de cavalo mantido em micro-aerofilia à tem peratura ambiente.

2.2.6. Distribuição nos animais

Diversas sub-espécies de C. fetus têm ocasionado uma grande variedade de doenças animais, tais como aborto, infertilidade e disenteria em bovinos (SMITH, 1918; PLASTRIDGE & WILLIAMS, 1943; JONES, ORCUTT & LITTLE, 1931) e ovinos (FIREHAMMER, MASH & TUNICLIFF, 1956); hepatite em frangos (PECKHAM, 1958) e disente ria em suínos (DOYLE, 1948). Na espécie humana o C. fetus sub-es pécie jejuni vem provocando gastroenterites em frequência igual ou superior aos microrganismos Salmonella e Shigella, em diversas partes do mundo (BLASER et al., 1979a e DELORME et al., 1979).

As espécies de Campylobacter encontram-se bastante difundi das em animais, notadamente bovinos, suínos, ovinos, aves, feli nos, caninos e roedores, como comensais ou patogênicos e, devido a isto, supõe-se que estas fontes representem papel importante na disseminação desses microrganismos para os seres humanos (SMIBERT 1978; BLASER et al., 1980c).

Em diversos países, o C. fetus sub-espécie jejuni tem sido isolado por vários pesquisadores, de várias espécies animais e inclusive do homem. Os isolamentos foram efetuados em amostras de pacientes com diarréia e também de animais sadios ou portadores (MORRIS & PARK, 1971). SMIBERT (1965, 1969) isolou o microrganismo de intestinos e fezes de bezerros, cordeiros, suínos, aves domésticas e selvagens, bem como de ratos. FERNIE & PARK (1977) relatam a ocorrência de C. fetus sub-espécie jejuni em fezes de ratos selvagens e de laboratório. Por outro lado, os autores não conseguiram isolar o microrganismo de coelhos, camundongos, "hamsteres" e ratos do campo.

No Brasil, o microrganismo já foi isolado de fezes de crianças normais e diarréicas, nos Estados do Rio de Janeiro (RICCIARDI et al., 1979), São Paulo (FERNANDEZ et al., 1982) e Pernambuco (MAGALHÃES et al., 1982).

JONES et al., (1931) isolaram pela primeira vez o C. fetus sub-espécie jejuni de lesões entéricas de vacas e bezerros com distúrbios intestinais e conseguiram reproduzir a doença em animais sadios, através da administração de culturas puras do microrganismo obtidas de animais doentes. Como o microrganismo localizava-se preponderantemente sobre a mucosa do jejuno, ocasionando a infecção, os pesquisadores propuseram a denominação de Vibrio jejuni. Entretanto, o microrganismo tem sido isolado de animais sadios (ELAZHARY, 1968; ALLSUP & HUNTER, 1973) bem como de diarréicos (ALLSUP & HUNTER, 1973), através de análises de fezes e intestinos de bezerros.

Mais recentemente, AL-MASHAT & TAYLOR (1980a), examinando 47 amostras de mucosa intestinal de bovinos "post-mortem", encontraram o Campylobacter sp. em 17 destas. Dentre os isolamentos, 7 foram identificados como C. fetus sub-espécie jejuni, 8 como C. fetus sub-espécie intestinalis e 1 como C. fecalis. Os autores conseguiram produzir diarreia e disenteria em bezerros através da administração oral de culturas puras de C. fetus sub-espécie jejuni em 9 animais empregados no ensaio. Em adição, AL-MASHAT & TAYLOR (1981) ao verificarem a patogenicidade do C. fecalis para bovinos, conseguiram produzir enterite em 6 bezerros e, contrário à opinião de FIREHAMMER (1965), consideram o microrganismo um agente patogênico primário para bezerros.

O C. fetus sub-espécie jejuni também já foi isolado do intestino de cordeiros (FIREHAMMER, 1965) e de caprinos (SMIBERT, 1974).

DOYLE (1944) relacionou os vibrios micro-aeróbios à disenteria suína, uma vez que obteve o isolamento de C. fetus sub-espécie jejuni de lesões do cólon de suínos diarreicos e reproduziu a doença em suínos sadios. Em 1948, DOYLE propôs a denominação de Vibrio coli ao microrganismo, devido à sua localização. Estes resultados foram confirmados por outros autores tais como JAMES & DOYLE (1947), ROBERTS (1956) e TAYLOR & OLUBUNMI (1981), mas há outros que discordam da patogenicidade do C. coli, como ANDRESS & BARNUM (1968), BOLEY et al. (1951) e TERPSTRA, AKKERSMANS & OUWERKERK (1968).

SÖDERLIND (1965) pesquisando o C. fetus sub-espécie jejuni do cólon de 82 suínos, 10 diarreicos e 72 sadios, isolou o microrganismo de 5 animais doentes e 39 do grupo sadio. Outros autores

também têm recuperado o Campylobacter sp. de suínos normais (OOSTEROM, 1980; STERN, 1981b). Ainda DEAS (1960) examinou 28 suínos e isolou o Campylobacter de 15. Este autor concluiu, entre tanto, que os campilobacteres são comensais do cólon de suínos, po is não conseguiu produzir a doença experimentalmente, mesmo subme tendo os animais a estresse violento de temperatura.

Somente recentemente é que FERNIE, GRIFFIN & PARK (1975) veri ficaram que a disenteria suína típica só podia ser reproduzida em suínos sadios através da administração oral conjunta de culturas puras de C. coli e Treponema hyodysenteriae.

Nos Estados Unidos, BRYNER et al. (1972) analisaram, em mata douros, 525 amostras de bile de bovinos e 186 amostras de bile de ovinos, encontrando o microrganismo em 12 % e 9 % das amostras ana lisadas, respectivamente.

Vírios micro-aeróbios têm sido isolados de bile, fígado e in testinos de frangos com hepatite vibriônica (PECKHAM, 1958). Nes tes animais a ocorrência do C. fetus sub-espécie jejuni tem sido mais pesquisada. Na Inglaterra, SIMMONS & GIBBS (1977) analisaram o conteúdo cecal de 50 frangos após o abate e encontraram o microrgan ismo em 14 % das amostras. Neste mesmo país BRUCE, ZOCHOWSKI & FERGUNSON (1977) analisaram 167 e RIBEIRO (1978) analisou 34 amos tras do conteúdo cecal de frangos e encontraram o microrganismo em 68 % e 91 % das amostras analisadas, respectivamente.

Nos EUA, GRANT et al. (1980) analisaram 46 amostras do conteú cecal de frangos e LUECHTEFELD & WANG (1981) analisaram amostras de 600 perus. O microrganismo foi encontrado em 83 % das amostras de frangos e 100 % das amostras de perus.

Na Holanda, GOREN & JONG (1980) encontraram o microrganismo no conteúdo do jejuno e na bile, em níveis de 28,6 % das amostras do jejuno e de 11,2 % das amostras de bile, de um total de 239 a amostras analisadas.

Em 1980, EIDEN & DALTON (apud BLASER, 1982) analisaram o conteúdo intestinal de 62 amostras de frangos e encontraram o microrganismo em 50 % das amostras.

Nos EUA, LUECHTEFELD, BLASER & WANG (1980) encontraram o microrganismo no conteúdo cecal de 35 % das 445 amostras de aves migratórias sadias (patos selvagens) estudadas. Ainda LUECHTEFELD & WANG (apud BLASER, 1982), isolaram o C. fetus sub-espécie jejuni de 43 % das 130 amostras analisadas do conteúdo cecal de bovinos.

Ainda, na Holanda, OOSTEROM (1980), analisando o conteúdo intestinal de 300 suínos recém abatidos, encontrou o C. fetus sub-espécie jejuni em 61% das amostras.

Quanto a presença nas fezes, SMIBERT (1978) encontrou o C. fetus sub-espécie jejuni em estado comensal, em número elevado e também no conteúdo intestinal de animais jovens, com tendência à diminuição quando no envelhecimento desses animais.

Em 1964, TRUSCOTT & MORIN verificaram que perus com enterite apresentavam vibrios micro-aeróbios, ou seja, campilobacteres, em suas fezes, e estes animais eram capazes de transmitir a infecção a perus mais jovens.

De acordo com SMIBERT (1974), os caprinos e ovinos também podem albergar o C. fetus sub-espécie jejuni em seus tratos intestinais. Este fato foi comprovado por trabalhos mais recentes apresentados por STERN (1981b) e GILL & HARRIS (1982), que revelam a

presença do microrganismo em fezes de ovinos. O primeiro autor obteve isolamentos positivos em 24 % das 15 amostras estudadas, oriundas de matadouros. GILL & HARRIS, por sua vez, conseguiram isolar o microrganismo tanto de ovinos adultos como de ovinos jovens.

Amostras obtidas de fezes de novilhos, oriundas de matadouros nos EUA e estudadas por PRESCOTT & BRUIN-MOSCH (1981), apresentaram o microrganismo num nível de ocorrência igual a 3 %. Na Nova Zelândia, entretanto, este porcentual foi mais elevado na pesquisa efetuada por GILL & HARRIS (1982), com 50 amostras de fezes de bezerros com 2 a 3 semanas de idade, sendo o microrganismo encontrado em 27 amostras.

Ainda na Nova Zelândia, GILL & HARRIS (1982) verificaram que 65 amostras de fezes de bovinos adultos não apresentaram o C. fetus sub-espécie jejuni. Do mesmo modo, a análise de 31 amostras de fezes de bovinos adultos, oriundas de matadouros dos EUA, não apresentou o microrganismo (STERN, 1981).

Pesquisas foram conduzidas também com o intuito de verificar a presença do C. fetus sub-espécie jejuni em fezes de suínos. Assim é que OOSTEROM (1980) analisou 300 amostras de fezes de suínos em abatedouros, encontrando o microrganismo em 182 (61 %) amostras. Em 1981, STERN conseguiu isolar o microrganismo em 87 % das 58 amostras de fezes de suínos estudadas.

Segundo SMIBERT (1978), o elevado número do C. fetus sub-espécie jejuni observado em suínos com disenteria pode ser devido à infecção primária ou à invasão secundária do microrganismo.

ATHERTON & RICKETTS (1980), pesquisando o C. fetus sub-espé

cie jejuni em equinos, isolaram o microrganismo das fezes de 5 po tros com história clínica de piroxia, colite e diarreia aguda.

Os caninos também têm sido implicados como fonte de campilo bacteres para os seres humanos. SKIRROW (1977) e BLASER et al. (1978) relacionaram casos de campilobacteriose humana aos conta tos com cães diarreicos, de cujas fezes conseguiram isolar o mi crorganismo. No Brasil, FERREIRA, RIBEIRO & RICCIARDI (1979) iso laram o campilobacter de 5,5 % das 90 amostras de fezes de ca ães diarreicos, porém não encontraram o microrganismo em amostras de 25 cães sadios.

PARK & STANKIEWCZ (1978) isolaram o microrganismo em 20 % das 100 amostras de fezes de frangos, oriundas do Canadá. PRE SCOTT & BRUIN-MOSH (1981) analisaram 94 amostras de fezes de pa tos dirigidos ao consumo e encontraram o campilobacter em 88 % das amostras estudadas. LUECHTEFELD et al. (1980) estudaram a fre quência do microrganismo em amostras de fezes e conteúdo cecal de patos selvagens migratórios sadios, e obtiveram 35 % de isolamen to das 445 amostras analisadas.

LAUWERS et al. (1981) relatam a ocorrência de C. fetus sub-es pécie jejuni em primatas importados, que frequentemente apresenta vam enterites, de cujas fezes isolaram o microrganismo em frequên cia de 60 a 80 % das amostras analisadas. Os pesquisadores verifi caram que os campilobacteres isolados apresentavam semelhanças às cepas isoladas da espécie humana.

Ainda, CISNEROS et al. (1981) relatam a presença do microrga nismo em 80 % das fezes de 10 saguis diarreicos. Entretanto, o mi crorganismo não foi encontrado nas fezes de animais sadios.

LUECHTEFELD, CAMBRE & WANG ((1981a) isolaram o microrganismo de fezes de várias espécies de animais de zoológico. Destes, 28 % dos 44 animais diarréicos analisados, apresentaram o C. fetus sub-espécie jejuni e somente 5,5 % das 575 fezes de animais sadios, a apresentaram o microrganismo.

De acordo com BLASER et al. (1980a) e LUECHTEFELD & WANG (1981), o número de campilobacteres encontrados em fezes de frangos, bovinos e caninos varia de 10^3 a 10^7 cél./g. Por sua vez, GILL & HARRIS (1981), encontraram um número médio na ordem de $1,6 \times 10^3$ colônias de campilobacteres por grama de fezes de bezerros, oriundas de matadouros. Por outro lado, GRANT et al. apresentaram resultados da análise de fezes do conteúdo intestinal de frangos recém abatidos, com uma contagem média de $4,4 \times 10^6$ cél./g.

Ainda com relação à presença do microrganismo nas fezes de frangos, PRESCOTT & BRUIN-MOSCH (1981) isolaram-no em 23, 8 % das amostras analisadas e SHANKER et al. (1982) isolaram-no em 134 amostras de fezes de frangos abatidos em abatedouros na Austrália.

2.2.7. Distribuição nas carcaças e alimentos crus de origem animal

Em decorrência do frequente isolamento do C. fetus sub-espécie jejuni da flora intestinal de animais de abate em números relativamente elevados, bem como pela suspeita destes animais serem responsáveis pela transmissão do microrganismo ao homem, vários pesquisadores se empenham na pesquisa do microrganismo em carca

ças e vísceras comestíveis de origem animal, devido à possibilidade da ocorrência de contaminação destes com material fecal durante as operações de abate, assim como em água, leite, ovos, etc.

SMITH & MULDOON (1974) analisaram nos EUA 165 partes de frangos (pescoço, fígado e carcaças) retiradas do comércio e encontraram o microrganismo em 2 % das amostras analisadas. Neste mesmo país, LUECHTEFELD & WANG (1981) pesquisaram o microrganismo em 33 carcaças frescas evisceradas, 83 resfriadas e 24 amostras de vísceras de perus recentemente abatidos e encontraram o C. fetus sub-espécie jejuni em 94, 94 e 33 % das amostras, respectivamente.

Na Inglaterra, vários pesquisadores têm demonstrado a contaminação das carcaças animais. Segundo BRUCE et al. (1977), a análise de 63 carcaças frescas de frangos apresentava o microrganismo em 39 amostras. SIMMONS & GIBBS (apud BLASER, 1982) analisando frangos eviscerados, sendo 50 amostras frescas, 25 resfriadas em água a 2°C e 10 resfriadas em ar, encontraram o microrganismo em 72, 80 e 80 % das amostras analisadas, respectivamente. Do mesmo modo, as carcaças de perus eviscerados, sendo 6 resfriados com água e 5 em ar, apresentaram o microrganismo em 83 e 100 % das amostras analisadas, respectivamente.

Em uma pesquisa efetuada nos EUA e Canadá, PARK et al. (1981) analisaram 100 amostras de frangos inteiros vendidos no comércio e encontraram o microrganismo em 62 % das amostras analisadas em Ontário e em 54 % das amostras analisadas em Ohio. GOREN & JONG (1980) analisaram, na Holanda, 750 amostras de carcaças de frangos congeladas e não encontraram o microrganismo. Na Austrália,

SMELTZER (1981) isolou o microrganismo em 47 (94 %) das 50 amostras de carcaças de frangos obtidas em balcões de empacotamento, imediatamente após a saída do tanque de resfriamento, em abatedouros. As contagens das amostras positivas situaram-se na faixa de 0 a $1,1 \times 10^5$ organismos por carcaça.

Ainda nos EUA, NORBERG (1981) pesquisando bactérias enteropatógenicas em frangos congelados expostos à venda no comércio, encontrou o C. fetus sub-espécie jejuni em 22 % das amostras analisadas. Nesse mesmo país, STERN (1981b) encontrou o C. fetus sub-espécie jejuni em carcaças de bovinos, ovinos e suínos em níveis de 2, 24 e 38 % das amostras analisadas, respectivamente. Do mesmo modo, EIDEN & DALTON (apud BLASER, 1982) analisaram 23 amostras de carcaças de frangos após congelamento e encontraram o microrganismo em todas as amostras. LUECHTEFELD & WANG (1981) isolaram o microrganismo de 94 % das 33 amostras de carcaças frescas evisceradas de perus. De acordo com os últimos pesquisadores, a manutenção de 83 carcaças contaminadas com o C. fetus sub-espécie jejuni em tanques com água clorada por uma noite, resultou na presença do germe em 34 % das amostras, mesmo na presença de 340 ppm de cloro residual.

Na Suécia, SVEDHEM, KAIJSER & SJOGREN (1981) isolaram o C. fetus sub-espécie jejuni de 6 das 10 amostras de frangos congelados, de 5 das 8 amostras de frangos frescos estocados a 4°C, de 11 das 24 amostras de frangos frescos e de 6 das 7 amostras de frangos congelados estocados por 3 meses.

SVEDHEM et al. (1981) isolaram o microrganismo de todas as 9 amostras de carne suína e bovina moídas, analisadas.

Nos EUA, CHRISTOPHER et al. (1982b) analisaram amostras de miúdos comestíveis de perus e frangos, através da técnica do número mais provável (NMP), para determinar a ocorrência de C. fetus sub espécie jejuni nestes alimentos. Os autores conseguiram isolar o microrganismo de 85 % das amostras de fígado e de 89 % das amostras de moelas de frangos eviscerados. O NMP da maioria das amostras positivas situou-se em níveis superiores a 1100 organismos por grama. Por outro lado, na análise de 86 amostras de moelas e 86 amostras de fígados de perus, somente uma amostra de moela a apresentou o microrganismo, a um nível de 9 organismos por grama. O microrganismo também foi isolado de 1 das 5 amostras de moelas congeladas de frangos, cujo NMP encontrado foi igual a 5 por grama. Os pesquisadores fizeram ainda tentativas no sentido de isolar o microrganismo de 100 amostras de leite cru e de 13 amostras de carne bovina, mas não tiveram resultados positivos.

2.2.8. Epidemiologia

Segundo KING (1962), o estudo das infecções ocasionadas por campilobacteres em seres humanos não pode ficar restrito a esta espécie, devido à grande distribuição desses microrganismos entre os animais, seja em estado comensal ou patogênico.

De acordo com SMIBERT (1978), os campilobacteres isolados de fezes de suínos, ovinos, aves e bovinos apresentam as mesmas características daqueles microrganismos isolados do homem. Ainda segundo o autor, provavelmente, o modo de transmissão entre os seres humanos é igual ao verificado em animais, ou seja, através da

ingestão de alimentos contaminados. Do mesmo modo, FLETCHER & PLASTRIDGE (1964b) verificaram que as cepas de campilobacteres i soladas de perus com disenteria eram similares às isoladas dos se res humanos. SMIBERT (1969) estudando os campilobacteres isolados de intestinos de pássaros encontrados próximos à criação de bovi nos e ovinos, verificou que os microrganismos apresentavam simila ridade morfológica, bioquímica e fisiológica com os campilobacte res isolados de fezes de frangos, perus e ovinos. Assim, o autor concluiu que o fato acima mencionado tem grande importância na de terminação de fatores epizootiológicos da campilobacteriose ani mal, bem como de fatores epidemiológicos da doença no homem.

FERNIE & PARK (1977) sugeriram que algumas infecções por cam pilobacteres de origem desconhecida em seres humanos poderiam ser originadas mais por contato com roedores do que com animais domés ticos.

LUECHTEFELD et al. (1980) supõem que a presença de C. fetus sub-espécie jejuni em número relativamente elevado em fezes de aves migratórias sadias pode ser uma fonte importante na contami nação da água ou mesmo de alimentos.

Segundo BRUCE et al. (1977), os frangos podem ser considera dos como fonte primária do C. fetus sub-espécie jejuni, pois o so ro de um paciente com campilobacteriose aglutinou tanto as cepas humanas, como aquelas isoladas de frangos, o que sugeriu a presen ça de um antígeno comum. Estes resultados também foram obtidos por HAYEK & CRUICKSHANK (1977).

Em 1981, JONES & ROBINSON, na Inglaterra, examinaram o soro de trabalhadores de matadouros de patos, frangos e bovinos dirigi

dos ao consumo humano, e verificaram que a prevalência de anticorpos contra C. fetus sub-espécie jejuni entre estes indivíduos é mais elevada que a encontrada na população normal e aproxima-se dos níveis encontrados em pessoas com enterites campilobacteriana devido à ingestão de leite cru.

De acordo com "DISEASE SURVEILLANCE CENTRE (Public Health Service)" e o "COMMUNICABLE DISEASES (Scotland) UNIT" (1978), a campilobacteriose humana tem sido associada ao contato e consumo de frangos contaminados com o microrganismo, bem como pelo consude outros alimentos crus ou cozidos que estiveram de algum modo em contato com frangos contaminados com o C. fetus sub-espécie jejuni.

Nos EUA, SCHAEFER et al. (1979) pesquisando bactérias enteropatogênicas em 238 amostras de fezes de pacientes diarréicos hospitalizados, encontraram o C. fetus sub-espécie jejuni em 10 casos; o C. fetus sub-espécie intestinalis em um, e em 5 casos foram isoladas salmonelas. Dentre os casos de campilobacteriose humana acima citados, um ocorreu em um paciente de 14 anos, quatro dias após haver depenado vários frangos. Na oportunidade, o C. fetus sub-espécie jejuni foi isolado das fezes do paciente, de frangos e suínos da fazenda onde ocorreu o incidente. Em duas ocasiões distintas, 5 pessoas desenvolveram gastro-esterite após consumirem frango mal passado. Embora o alimento suspeito não estivesse disponível para análise, os autores já haviam cultivado o C. fetus sub-espécie jejuni dos frangos abatidos e refrigerados, oriundos da loja distribuidora que os fornecia para o local onde ocorreu um dos incidentes.

Segundo HAYEK & CRUICKSHANK (1977), os frangos poderiam ter sido indiretamente os responsáveis por um surto de enterite ocorrido na Inglaterra, acometendo 5 das 29 pessoas presentes em uma recepção. Os autores isolaram o C. fetus das fezes e do sangue de dois pacientes, bem como verificaram elevados títulos de anticorpos contra campilobacteres no soro dos pacientes. Mais tarde, isolaram campilobacteres da superfície de frangos obtidos da loja distribuidoras, que supriu os frangos para a recepção. Como os frangos crus haviam sido cortados em uma superfície que posteriormente serviu para preparação de vários alimentos cozidos (carnes), os autores supuseram que ocorreu uma contaminação cruzada e que as infecções resultaram do consumo daqueles alimentos contaminados.

Em 1978, PEEL & McINTOSH relataram um episódio interessante envolvendo uma enfermeira que adoeceu 24 horas após ter ingerido um lanche contendo carne de porco. Porções desse lanche foram dadas à sua irmã que o rejeitou após ter cheirado e por sua vez deu a um cão que ficou doente 4 dias após a ingestão e morreu 36 horas depois. O Campylobacter sp. foi isolado das fezes da enfermeira e do sangue, tecidos e fezes do cão.

Na Holanda, BROUWER et al. (1979) relataram um surto de enterite por campilobacteres em um quartel, acometendo 89 dos 123 cadetes implicados. Uma semana após o incidente, o C. fetus sub-espécie jejuni foi isolado de 34 das 104 amostras de fezes dos cadetes. O surto foi relacionado à ingestão de frangos contaminados com o microrganismo, em decorrência do emprego de métodos inadequados de preparação, manuseio e cozimento. Neste mesmo país, SEVERIN (apud BLASER, 1982) associou frangos mal cozidos à infecção huma

na.

Em Los Angeles, SHANDERA (1981) (apud BLASER, 1982) estudando pacientes com bacteriemia por C. fetus sub-espécie jejuni, relacionou a doença à ingestão de carne de peru processada.

OOSTEROM et al. (1980) relataram um surto de enterite por campilobacteres em um quartel, acometendo 54 pessoas. A análise de fezes de 51 pessoas revelou a presença do microrganismo em 13 dos casos. Através de um ensaio sorológico, os autores encontraram tí tulos de anticorpos contra o microrganismo superiores a 1 :160 em 19 das 41 amostras de soro analisadas e em 10 casos esta foi a única evidência da infecção. Em todas as tentativas efetuadas pa ra verificar a causa, a ingestão de hamburques crus tinha sido a mais provável origem da infecção.

No Japão, YANAGISAWA (1980) verificou um surto de gastro-enterite ocasionado, provavelmente, pela ingestão de lanche preparado com carne de porco. Neste surto, 2500 crianças foram envolvidas, sendo que 800 desenvolveram enterite por campilobacter.

Segundo BLASER, FELDMAN & WELLS (apud BLASER, 1982), nos EUA (Nova Jersey), a ingestão de mexilhão cru estava associada à ocorrência de 2 surtos de campilobacteriose.

Em um acampamento de verão, nos Estados Unidos, BLASER et al. (1981) relataram um surto de gastro- enterite em 41 pessoas e o C. fetus sub-espécie jejuni foi isolado de 16 pacientes e de ne nhuma das 63 amostras do grupo controle. Através de ensaio sorológ ico os autores verificaram que as cepas isoladas eram idênticas. Embora a fonte da contaminação não tenha sido encontrada, os autores verificaram que o consumo de bolo, particularmente a cobertu

ra aplicada sobre o bolo pronto, apresentou relação significativa com a doença. Nesta mesma pesquisa, o Campylobacter foi isolado das mãos de uma das pessoas sintomáticas que preparava salada para os soldados, mas a salada não foi comprovada estatisticamente como causadora do surto.

Dentre os mais importantes veículos incriminados como transmissores de Campylobacter sp., o leite assume o principal papel, tanto em termos de número de surtos relatados quanto em relação ao número de pessoas acometidas em cada surto. Na maioria dos casos em que o leite está envolvido existem relatos de falhas no sistema de pasteurização.

Em 1979, TAYLOR, WEINSTEIN & BRYNER relataram a ocorrência de 4 casos de campilobacteriose humana em Los Angeles (EUA), cujo agente foi isolado do sangue dos 4 pacientes. Três dos pacientes examinados haviam bebido leite cru de uma mesma marca e o microrganismo isolado foi o C. fetus sub-espécie jejuni. Um ensaio sorológico foi efetuado através de aglutinação direta do soro contra uma cepa de C. fetus sub-espécie jejuni de um dos pacientes, incluindo 23 indivíduos que ingeriram leite cru e 13 indivíduos como controle. Destes, 4 que ingeriram leite cru (17 %) apresentaram títulos altos de anticorpos contra o antígeno e, como seria esperado, nenhum indivíduo do grupo controle apresentou títulos. Um quarto paciente que não havia ingerido leite cru apresentou o C. fetus sub-espécie intestinalis na hemocultura efetuada.

ROBINSON et al. (1979) verificaram 2 surtos de campilobacteriose humana na Inglaterra, ocasionados por campilobacteres tolerantes ao calor. Os organismos isolados das fezes dos pacientes e de

vacas eram indistinguíveis nos dois surtos. Em um dos surtos, os autores isolaram o Campylobacter sp. dos dedos das ordenhadeiras em 2 das 45 análises realizadas, após 26 dias da ocorrência do primeiro caso de enterite. Além disso, como não existem relatos associando a excreção de campilobacter pelo leite, os autores concluíram que provavelmente ocorreu contaminação fecal do leite e isto deu origem aos dois surtos.

Na Escócia, WALLACE (1980) relata a ocorrência de um surto de gastro-enterite por Campylobacter sp. envolvendo 648 pessoas, associado à ingestão de leite não pasteurizado. O microrganismo foi isolado de um filtro pelo qual o leite tinha passado, mas as tentativas efetuadas para isolá-lo do leite foram infrutíferas.

Nos EUA, TOSH, MULLEN & WILCOX (1981) associaram um surto de enterite por campilobacter à ingestão de leite cru. Os autores isolaram o microrganismo de vacas sãs e com mastite, após o incidente, mas não isolaram de amostras de leite. BLASER et al. (1979b) também relacionaram 3 casos de enterite por campilobacter à ingestão de leite cru. O C. fetus sub-espécie jejuni foi isolado dos pacientes e das fezes da vaca que havia fornecido o leite e também de suínos. Entretanto, as análises de fezes de pintos, galinhas, ovelhas, cães, bovinos, assim como de amostras de leite e água, deram resultados negativos.

De acordo com ROBINSON & JONES (1981), o consumo de leite cru ou mal pasteurizado foi o responsável pelo aparecimento de 13 surtos de enterites por C. fetus sub-espécie jejuni na Inglaterra. Segundo os autores, o C. fetus sub-espécie jejuni é membro comensal do trato intestinal das vacas leiteiras, mas ainda não se

conhece como ocorre a contaminação do leite pelo microrganismo.

A água também tem sido incriminada como veículo da infecção por campilobacter. Em 1978, nos EUA, TIEHAN & VOGT relataram um surto de gastro-enterite por Campylobacter envolvendo 2000 pessoas. Os pesquisadores, através de uma investigação epidemiológica, observaram uma forte associação entre a doença e o consumo de água potável do suprimento municipal ($p \leq 0,005$). Através do método da zaragatoa retal os autores isolaram o C. fetus sub-espécie jejuni de 5 dos 9 pacientes estudados, mas nenhuma das 20 amostras de pessoas sadias analisadas apresentaram o microrganismo. Neste período foi verificado que as amostras de água não apresentavam cloro residual durante o surto.

PORTER & REID (1980) verificaram um surto de enterite envolvendo 148 pessoas. O C. fetus sub-espécie jejuni foi isolado de todos os pacientes doentes e de 57 assintomáticos e todos tinham ingerido leite cru. Em decorrência de uma falha térmica na planta de pasteurização do leite e do isolamento do microrganismo de um dos filtros da fábrica, os autores relacionaram o surto à ingestão de leite cru contaminado.

2.2.9. Gastro-enterite humana

Os casos de gastro-enterite humana ocasionados pelo C. fetus sub-espécie jejuni são verificados mais frequentemente em crianças, mas também ocorrem em seres humanos de todas as idades, particularmente nos meses mais quentes do ano, em todos os continentes (LEVI, 1946; BUTZLER et al., 1973; SKIRROW, 1977; TAYLOR et

al., 1979; BLASER, 1980; SVEDHEM & KAIJSER, 1980; BUTZLER & SKIRROW, 1979; BOKKENHEUSER et al., 1979 e RICCIARDI et al., (1979).

Nos países desenvolvidos, o papel patogênico desse microrganismo já está bem estabelecido (BUTZLER & SKIRROW, 1979; STEELE & McDERMONT, 1978 e ROBINSON, 1981). Nestes países existem relatos considerando a infecção por Campylobacter termotolerante tão importante como a ocasionada por Salmonella, particularmente devido ao isolamento do microrganismo em taxas iguais ou superiores aos casos de salmoneloses (BLASER et al., 1979a; BRUCE et al., 1977; DELORME et al., 1979 e BLASER et al., 1980a).

Por outro lado, nos países em desenvolvimento, a gastro-enterite por C. fetus sub-espécie jejuni também já foi diagnosticada em taxas semelhantes àsquelas dos países desenvolvidos. Entretanto, nesses países, os campilobacteres termotolerantes têm sido isolados em frequência elevada nas fezes de pacientes sadios e até mais elevada que nas fezes dos pacientes diarréicos (BOKKENHEUSER et al., 1979; BLASER et al., 1980b e FERNANDEZ et al., 1982). Desse modo, nos países desenvolvidos, as pessoas sadias raramente excretam esses microrganismos em suas fezes, mas nos países em desenvolvimento os microrganismos podem ser isolados das fezes de crianças assintomáticas (BLASER et al., 1980b), o que dificulta o diagnóstico. Segundo BLASER (1980), provavelmente este fato está relacionado às condições de higiene, embora as rações para essas ocorrências não sejam conhecidas. A propósito, PRESCOTT & MUNROE (1982) extrapolam essas observações para muitas espécies de animais domésticos que vivem em péssimas condições sanitárias e onde a prevalência da infecção por esse microrganismo

também é alta, mesmo em animais sadios.

No Brasil, no Estado do Rio de Janeiro (RICCIARDI et al., 1979), Pernambuco (MAGALHÃES et al., 1982) e São Paulo (FERNANDEZ et al., 1982), a doença foi verificada em crianças com diarreia, de cujas fezes o C. fetus sub-espécie jejuni foi isolado.

No quadro de nº 4, apresentamos as taxas de ocorrência de C. fetus sub-espécie jejuni em fezes de seres humanos de diversos países.

Embora o C. fetus sub-espécie jejuni tenha sido isolado inicialmente com mais frequência do sangue, meninge e trato urinário do homem ou de outras fontes usualmente estéreis (MEGRAUD & LATRILLE, 1981), o desenvolvimento de técnicas de coproculturas mais específicas permitiram concluir que a infecção por esse microrganismo ocorre predominantemente no trato intestinal (BUTZLER & SKIRROW, 1979).

De acordo com CADRANEL et al. (1973), a campilobacteriose humana é transmitida por ingestão e os microrganismos vão se alojar nos intestinos, onde causam o síndrome diarréico. Ocasionalmente, os campilobacteres podem invadir a corrente sanguínea, provavelmente durante a fase diarréica, devido à alteração da flora intestinal ou até mesmo por alguma deficiência imunológica.

QUADRO 3 - TAXAS DE ISOLAMENTO DE CAMPYLOBACTER FETUS SUB-ESPÉCIE
JEJUNI DE FEZES HUMANAS

Local	Número de positivos / Número testado		Referência
	Pacientes diarreicos	Controle ^d	
Austrália	13 / 224 (5,8 %)	0 / 530 (0,0 %)	STEELE & McDERMONT (1978)
	17 / 386 (5,0 %)	0 / 332 (0,0 %)	KIRUBAKARAN <u>et al.</u> (1981)
Bélgica	41 / 800 (5,1 %)	13 / 1000 (1,3 %)	BUTZLER <u>et al.</u> (1973)
Brasil	9 / 186 (4,8 %)	ND	RICCIARDI <u>et al.</u> (1979)
	16 / 262 (6,1 %)	7 / 78 (9,0 %)	FERNANDEZ <u>et al.</u> (1982)
	15 / 80 (18,5 %) ^c	ND	MAGALHÃES <u>et al.</u> (1982)
Canadá	43 / 1004 (4,3 %)	0 / 176 (0,0 %)	PAI <u>et al.</u> (1979)
Escócia	17 / 196 (8,7 %)	0 / 50 (0,0 %)	TELFER- BRUNTON & HEGGIE (1977)
EUA	27 / 532 (5,1 %)	0 / 81 (0,0 %)	BLASER <u>et al.</u> (1979a)
	17 / 29 (59,0 %)	ND	TOSH <u>et al.</u> (1981)
	4 / 8 (50,0 %)	ND	TOSH <u>et al.</u> (1981)
	39 / 956 (4,1 %)	0 / 548 (0,0 %)	BLASER <u>et al.</u> (1980c)
	8 / 12 (66,7 %) ^a	1 / 32 (3,0 %) ^b	BLASER <u>et al.</u> (1980c)
Inglaterra	57 / 803 (7,1 %)	0 / 194 (0,0 %)	SKIRROW (1977)
	12 / 280 (13,9 %)	1 / 156 (0,6 %)	BRUCE <u>et al.</u> (1977)
	19 / 330 (5,8 %)	1 / 120 (0,8 %)	TANNER & BULLIN (1977)
África do Sul	27 / 78 (35,0 %)	10 / 63 (16,0 %)	BOKKENHEUSER <u>et al.</u> (1979)
Bangladesh	5 / 97 (5,2 %) ^c	25 / 141 (17,7 %)	BLASER <u>et al.</u> (1980b)
	25 / 204 (12,3 %)		BLASER <u>et al.</u> (1980b)
Ruanda	22 / 204 (10,8 %)	0 / 58 (0,0 %)	De MOL & BOSMANS (1978)

ND - Não determinado

a - Pacientes sintomáticos em contato com pacientes positivos com diarreia

b - Pacientes assintomáticos em contato com pacientes positivos com diarreia

c - Pacientes com diarreia sanguinolenta, ou seja, disenteria clínica

d - Pacientes sadios

A doença no homem se iguala ou excede a salmonelose como causa de diarreia bacteriana (BUTZLER & SKIRROW, 1979; KARMALI & FLEMING, 1979a; BLASER et al., 1979b e BRUCE et al., 1977). O curso típico da doença é moderado e usualmente manifesta-se clinicamente como uma diarreia aguda que pode persistir por uma semana. A diarreia é aquosa ou muco sanguinolenta, com febre ou não, acompanhada por vômitos. Dores abdominais geralmente precedem a diarreia. Também podem ocorrer sintomas como indisposição, cefaléias, dores nos músculos esqueléticos (BUTZLER & SKIRROW, 1979; KARMALI & FLEMING, 1979a).

Segundo BLASER et al., (1979a) a presença de leucócitos e sangue nas fezes dos indivíduos doentes sugere um mecanismo invasor. Do mesmo modo, BLASER, PARSONS & WANG (1980d) consideram que a bacteriemia por C. fetus sub-espécie jejuni indica indiretamente aquele mecanismo. De acordo com BUTZLER & SKIRROW (1979) os campilobacteres termotolerantes são, à semelhança de Salmonella, Yersinia e E. coli, patogênicos principalmente por mecanismo invasor, mas algumas cepas podem apresentar uma enterotoxina termo-estável. Ainda, de acordo com JARAMILLO (1982) o C. fetus sub-espécie jejuni provavelmente produz duas toxinas: uma termolábil, capaz de alterar os mecanismos que regulam a absorção de glicose bem como a absorção facilitada de sódio e outra, termo-estável capaz de alterar os mecanismos reguladores da secreção de sódio.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material

3.1.1. Carcaças

Foram analisadas 120 amostras de carcaças provenientes de matadouros sob Inspeção Federal, no Estado de São Paulo, sendo 40 de frangos de 55-60 dias, abatidos num matadouro localizado em Paulínea; 40 de suínos adultos de dois matadouros localizados em Piracicaba e em Vinhedo e 40 de bovinos adultos de dois matadouros localizados em Piracicaba e Valinhos. A colheita do material foi feita durante o período de outubro de 1981 a janeiro de 1982.

3.1.2. Material de laboratório

O equipamento por nós utilizado constou do que a seguir se expõe.

- Um aparelho para obtenção de atmosfera micro-aeróbia, adaptado às nossas condições de trabalho, composto de jarras para anaerobiose constituídas de recipientes plásticos ou painéis de pressão a cujas tampas se adaptaram duas torneiras do tipo das utilizadas em instalações de gás, uma destinada à tubulação de borracha ligada à bomba de vácuo e a outra destinada a idêntica tubulação em "T" para o manômetro e para os cilindros de nitrogênio e anidrido carbônico (SERRANO, 1976).

-Microscópio óptico, marca Zeiss.

- Microscópio de contraste de fase, marca Nikon.
- Potenciômetro, marca Micronal.
- Balança analítica, marca Sauter, P. 200.
- Estufas, marca Fanem.
- Incubador de temperatura controlada.
- Contador de colônias, marca Hellige.
- Moldes metálicos com abertura retangular de 3 x 5 cm.
- Zaragatoas com haste de 14 cm de comprimento, contendo em uma extremidade algodão não absorvente com medida de 1,3 cm de diâmetro por 3 cm de comprimento.
- Bomba de vácuo 1/3 C.V.
- Demais materiais de uso comum em laboratório.

3.2. Métodos

3.2.1. Coleta e tratamento das amostras

As amostras das carcaças eram retiradas das linhas de matança de modo intermitente.

As de frango eram retiradas sobre a pele em 3 regiões: no peito, no dorso e no ventre, nas proximidades da cloaca. Estas amostras eram colhidas na mesa de embalagem de carcaças frescas evisceradas.

As amostras de suínos e bovinos eram coletadas após a lavagem final das carcaças, depois da divisão destas em duas metades e nas seguintes regiões: nos músculos do pescoço, na parede abdominal, pelo lado interno, próximo às costelas e à rafe e nos músculos adutores da coxa, no local por onde a serra os dividiu.

Utilizamos zaragatoa estéril que era molhada em 10 ml de água peptonada a 0,1%, e o excesso do líquido era espremido de encontro às paredes do tubo e a zaragatoa era passada pela área de 15cm² de limitada pelo molde, repetindo-se este procedimento mais duas vezes em cada área. Finalmente, o cabo da zaragatoa era partido contra as paredes do tubo, no local logo abaixo daquele em que era segura pelo operador. O tubo era a seguir rosqueado e acondicionado em caixa de isopor contendo gelo. Como se amostravam mais 2 regiões, a área total somava 45 cm² por carcaça.

O exame em laboratório era feito dentro de aproximadamente 3 horas após a colheita.

As alíquotas das diluições eram colocadas sobre a superfície de placas de Petri em duplicata, previamente secas a 42°C por 20 min., contendo ágar nutriente-hematina seletivo para Campylobacter (RAZI & PARK, 1979) e espalhadas com espátula de Drigalski.

3.2.2. Atmosfera de incubação

As placas, uma vez inoculadas, eram colocadas em jarras para anaerobiose, cuja atmosfera micro-aeróbia era obtida pelo uso de uma bomba que proporcionava 500 mm de Hg de vácuo. Posteriormente, era injetada uma mistura de gases constituída de 90% de nitrogênio e 10% de anidrido carbônico, de acordo com SKIRROW & BENJAMIN, 1980a e HOLDEMAN et al., 1977. Uma cultura controle de C. fetus sub-espécie jejuni era sempre incubada juntamente com as amostras em análise. Dentro da jarra colocava-se cloreto de cálcio granulado para retirar a umidade da atmosfera.

A incubação das placas era efetuada a 42°C por, pelo menos, 72 horas (PATTON et al., 1981).

3.2.3. Contagem, isolamento e confirmação

As placas eram examinadas após 48 a 72 horas de incubação e descartadas após 72 horas, se negativas. Naquelas positivas as colônias eram contadas e a confirmação das colônias era feita sobre 10% do total, mas nunca menos de 3 (MOSSEL & QUEVEDO, 1967), submetendo-as à coloração de Gram e verificando a motilidade e morfologia (BUTZLER & SKIRROW, 1979). A coloração ao Gram era feita pelo emprego de fucsina de Ziehl diluída (carbol-fucsina) como corante de contraste (WANG et al., 1978). Para verificação da motilidade as colônias eram suspensas em caldo tripticase e examinadas em microscópio de contraste de fase (CHESTER & POULOS, 1980).

Após a verificação da morfologia e motilidade, as colônias ou culturas eram purificadas em placas de ágar nutriente-hematina seletivo, em atmosfera micro-aeróbia a 42°C, por 24 a 48 horas.

Para execução dos testes usuais de identificação do C. fetus sub-espécie jejuni, as colônias eram inoculadas na porção superior (10 mm abaixo da superfície) do meio basal de caldo Albimi para brucela com 0,16% de ágar, conforme HOLDEMAN et al. (1977), e incubadas em aerobiose a 42°C por 48 horas. Desta cultura retiravam-se inóculos através de uma alça dupla de níquel ou com uma pipeta e inoculavam-se nos meios empregados para identificação do microrganismo, conforme a seguir:

3.2.4. Testes bioquímicos e fisiológicos

3.2.4.1. Formação de células cocóides

Para este teste uma cultura de C. fetus sub-espécie jejuni de 48 horas, era exposta à temperatura e atmosfera ambiente por 48 horas. A seguir procedia-se a uma coloração pelo Gram e observava-se o aparecimento de células cocóides (KARMALI, ALLEN & FLEMING, 1981).

3.2.4.2. Crescimento em ágar nutriente simples

Para execução desta prova inoculava-se com a cultura uma placa de ágar nutriente simples (KING, 1962). A incubação era feita em micro-aerobiose a 42°C por 72 horas. A leitura era feita pela observação do crescimento.

3.2.4.3. Produção de catalase e oxidase

Para estes testes inoculavam-se placas de ágar nutriente com as culturas provenientes do meio basal e incubavam-se em micro-aerobiose a 42°C por 24 a 48 horas.

O teste de catalase era feito transferindo-se uma porção da colônia para uma lâmina de vidro contendo uma gota de peróxido de hidrogênio a 3% (VÉRON & CHATELAIN, 1973). A confirmação da produção de catalase sempre era feita em tubos, onde cresciam os microrganismos, e nos quais se juntava posteriormente 0,5 a 1 ml de peróxido (HOLDEMAN et al., 1977). A reação era positiva quando, sobre

a massa celular, ocorria efervescência, dentro de 1 a 5 minutos.

Pra o teste de oxidade, colhiam-se, da placa de Petri, com auxílio de uma alça de níquel, porções do crescimento microbiano, e em seguida esfregavam-se-as sobre uma tira de papel de filtro impregnada de uma solução de tetrametil p-fenilenodiamina a 1% (p/v). A reação era positiva quando a massa celular denotava coloração violúcea dentro de 5 a 10 segundos (SKIRROW & BENJAMIN, 1980a). Do mesmo modo, uma cultura de Escherichia coli também era utilizada para controle.

3.2.4.4. Teste para fermentação e oxidação da glicose

Para o teste de oxidação inoculava-se, com os microrganismos em estudos, os meios de Hugh & Leifson (VÉRON & CHATELAIN, 1973) e o meio basal (HOLDEMAN et al., 1977), aos quais era adicionado 1% de glicose esterilizada em filtro Millipore.

Para o teste de fermentação usávamos o mesmo procedimento, mas depois de adicionarmos a glicose, os tubos eram aquecidos em banho-maria por 10 minutos, esfriados, inoculados com o microrgannismo e cobertos com uma camada de vaspar (vaselina e parafina , 50/50%). A incubação era feita ^{em} aerobiose a 37°C por uma semana.

A leitura dos resultados era feita pela observação da coloração do indicador do meio. A reação era negativa se os meios permanciam com a cor original, laranja no meio basal ou verde no meio de Hugh & Leifson, ou então vermelha ou azul, consequência de uma produção de álcalis naqueles meios. Era positiva quando a coloração passava para amarelo em ambos os meios.

3.2.4.5. Redução de nitratos a nitritos

Para este teste, inoculava-se, com a cultura em estudo, o meio basal adicionado de 1% de nitrato de potássio. A incubação era feita ^{em} aerobiose a 37°C por uma semana. A leitura era feita adicionando-se 1 ml de cada reagente para detecção de nitritos. A reação positiva era traduzida pelo desenvolvimento de uma cor vermelha imediatamente, sobre o meio (HOLDEMAN et al., 1977).

3.2.4.6. Produção de sulfeto de hidrogênio

A produção de sulfeto de hidrogênio era verificada por dois procedimentos:

a) produção de sulfeto de hidrogênio em meio basal com 0,02 % de hidrocloreto de cisteína e em meio basal sem cisteína. Inoculavam-se os tubos com a cultura, colocava-se no topo dos tubos uma tira de papel de filtro impregnada com solução saturada de acetato de chumbo (HOLDEMAN et al., 1977) e incubavam-se em aerobiose a 37°C por uma semana; a reação positiva era indicada pelo enegrecimento da tira de papel de filtro suspensa sobre o meio;

b) produção de sulfeto de hidrogênio em meio de tríplice - açúcar-ferro (TAF - DIFCO). Este meio, inclinado, era inoculado com a cultura, usando-se uma agulha de níquel que o perfurava e depois estriava-se também a superfície. A incubação era micro-aeróbia por 10 dias (HOLDEMAN et al., 1977). A reação positiva era indicada pelo enegrecimento no lugar da picada do meio.

3.2.4.7. Crescimento em 1% de glicina, 8% de glicose e 3,5% de cloreto de sódio

A partir do meio basal com crescimento do microrganismo eram realizadas inoculações em 3 tubos de meio basal, cada um com uma das substâncias acima mencionadas. Os tubos inoculados eram incubados aerobiamente a 37°C por uma semana.

A presença de claro crescimento, sob a forma de um anel abaixo da superfície dos meios, era considerada como prova positiva / (HOLDEMAN et al., 1977 e VÉRON & CHATELAIN, 1973).

3.2.4.8. Crescimento a 25°C e 42°C

Estes testes eram efetuados inoculando-se a cultura em meio basal, em duplicata. Um tubo era incubado a 25°C e o outro a 42°C, em atmosfera aeróbia por uma semana. Do mesmo modo que os testes anteriores, o crescimento era observado como em 3.2.4.7., quando a prova era positiva.

3.2.5. Testes de tolerância

De modo geral, para efetuar quaisquer dos testes de tolerância empregava-se como meio basal o ágar nutriente com hematina a 0,001% ou com 7% de sangue defibrinado de carneiro, em placas. Após inoculação com a cultura, incubava-se em atmosfera micro-aeróbia a 37°C por 72 horas, exceto quando o crescimento já se tornava claro em menor período de tempo (HOLDEMAN et al., 1977 e VÉRON & CHATELAIN,

1973).

3.2.5.1. Crescimento em verde brilhante

Para este teste a cultura em estudo era inoculada em uma placa com meio basal contendo 30,3 µg do corante por ml do meio e em outra placa com o corante em meio basal numa concentração de 10µg/ml (VÉRON & CHATELAIN, 1973).

3.2.5.2. Crescimento em cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazolium

Este teste era efetuado estriando-se a cultura em duas placas com meio basal contendo 1,0 mg e 0,4 mg de cloreto de trifeniltetrazolium por ml do meio. As colônias redutoras do sal de tetrazolium apresentavam-se vermelhas (LUECHTEFELD & WANG, 1982).

3.2.5.3. Crescimento em aerobiose e anaerobiose

Os testes eram conduzidos plaqueando-se a cultura em meio basal, em duplicata, e incubando-se uma placa em atmosfera aeróbia e a outra em anaerobiose. A temperatura de incubação era de 37°C e o período de uma semana (HOLDEMAN et al., 1977).

3.2.5.4. Sensibilidade ao ácido nalidíxico

Este teste era feito estriando-se a cultura em placas com meio basal e colocando-se no centro das estrias um disco de papel de

filtro com ácido nalidíxico na concentração de 30 µg. Qualquer zona de inibição era interpretada como microrganismo sensível (HOLDEN et al., 1977).

3.2.6. Manutenção das culturas

As culturas de C. fetus sub-espécie jejuni eram mantidas em caldo Albimi para brucela com 0,16% de ágar, meio líquido de tioglicolato (DIFCO) e meio reforçado para Clostridium, adicionado de 0,3% de extrato de levedura e 0,3% de aspartato de potássio e cloreto de sódio.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Da identificação das cepas do microrganismo

4.1.1. Morfologia

Os campilobacteres isolados de carcaças de frangos apresentaram dois tipos de colônias ao isolamento direto em ágar nutriente seletivo com hematina, a 42°C por 48 horas. O tipo mais comum apresentava colônias pequenas a médias com cerca de 0,3 a 1,0 mm de diâmetro, convexas, com bordos geralmente regulares, ligeiramente translúcidas nos bordos e com o centro pardo bronzeado, ligeiramente opaco à luz refletida. Estas colônias aumentavam de diâmetro (1,5 - 3,0 mm) e perdiam o brilho, tornando-se foscas com a incubação por 72 horas.

O segundo tipo de colônias apresentava-se como um crescimento isolado, achatado e abundante ao longo ou ao lado das estrias, irregular, brilhante e transparente. Este tipo também se encontrava como colônias grandes de 3 a 4 mm de diâmetro, espalhadas e baixas, com bordos irregulares às vezes apiculados, translúcidas, com tendência a espalharem-se e coalescerem-se.

O exame morfológico das colônias de campilobacteres termotolerantes isolados de amostras de carcaças de frangos foi inicialmente dificultado devido principalmente ao elevado número de microrganismos termotolerantes contaminantes, notadamente bastonetes Gram negativos, Gram positivos e leveduras, que apresentavam colônias com alguma similaridade morfológica com a dos campilobacteres.

Os campilobacteres isolados de carcaças de suínos apresentaram maior variação morfológica. As colônias mais comumente encon

tradas eram semelhantes às do tipo descritas para os campilobacteres isolados de frangos, porém eram maiores e mais douradas no centro. Também foram encontradas colônias pequenas, circulares e ovais, brilhantes, lisas e transparentes como gotículas de água. Do mesmo modo, ao microscópio, as colônias apresentavam bordos inteiros e circulares, convexas baixas e com o centro amarelado, finamente granulares. Após incubação prolongada, as colônias eram maiores, mais viscosas e mais amareladas.

Todas as colônias foram facilmente emulsionadas em água peptonada. Quando qualquer colônia era repicada em ágar nutriente, dava origem a colônias de todos os tamanhos, desde gotículas de 0,5 mm até 2,0 mm de diâmetro, com características semelhantes às do primeiro tipo.

Ao examinarmos a morfologia celular e motilidade em microscopia de contraste de fase, encontramos células curtas curvas, assemelhando-se à letra S e formas helicoidais, com extremidades pontiagudas e extremamente móveis. Ao teste de Gram, as células se apresentavam como formas cilíndricas curvas, isoladas e em espirais, como a letra S, lembrando gaivotas e algumas em espirais com 3 a 4 espiras.

A exposição das placas com as colônias ao ar por 48 horas à temperatura ambiente redundou no aparecimento de células cocóides, inviáveis. Este fato ocorreu com todas as cepas dos campilobacteres isoladas.

Do mesmo modo, a incubação prolongada das células em meio semi-sólido reforçado para clostrídios resultou na presença de células unidas em espirais relativamente longas, formando emaranhados.

O exame da morfologia e motilidade celulares em microscopia

permitiu dirimir as dúvidas suscitadas pela morfologia das colônias e desta forma contribuiu significativamente para um diagnóstico presuntivo diferencial para campilobacteres. O caráter variável da morfologia celular, particularmente a formação de células cocóides em culturas envelhecidas ou expostas ao oxigênio atmosférico, é uma característica típica dos campilobacteres e a exemplo de RISTIC, WHITE & DOTY (1958), permite diferenciá-los de outras bactérias Gram negativas móveis por flagelos polares.

As características morfológicas das colônias e das células dos campilobacteres isolados de frangos e suínos correspondem às relatadas por SMIBERT (1965) e DOYLE (1948), respectivamente. Estas características morfológicas são comparáveis às do C. fetus sub-espécie jejuni enunciadas por SMIBERT (1974), KARMALI, ALLEN & FLEMING (1981) ou ao grupo coli-jejuni segundo VÉRON & CHATELAIN (1973) e SKIRROW & BENJAMIN (1980a).

Em meio semi-sólido, o crescimento invariavelmente ocorria entre 1 a 3 mm abaixo da superfície do meio, caracteristicamente como um anel esbranquiçado delgado, semelhante ao observado por SMIBERT (1974), após incubação aeróbia a 42°C por 24 a 48 horas. Este crescimento tornava-se abundante, espesso e viscoso, após incubação prolongada nas mesmas condições.

4.1.2. Comportamento cultural, bioquímico-fisiológico e de sensibilidade

4.1.2.1. Produção de catalase e oxidase

Todas as cepas de campilobacteres isoladas de frangos e suí

nos produziram as enzimas citocromo-oxidase e catalase (Quadros 4 e 5).

No estudo de campilobacteres termotolerantes isolados, a produção de catalase representa importância em saúde pública, visto que esta é uma das propriedades das espécies patogênicas do grupo. Contudo, em uma amostra de suíno, S 23, além de campilobacteres produtores de catalase, encontrou-se uma cepa não produtora da enzima. SODERLIND (1965) e SMIBERT (1978), também relataram a presença de campilobacteres não produtores de catalase em fezes de suínos.

4.1.2.2. Redução de nitratos

Todas as cepas isoladas reduziram os nitratos a nitritos (Quadros 4 e 5). Embora DOYLE (1948) relate a ocorrência de cepas de Campylobacter (V. coli), causadoras da disenteria suína, não redutoras de nitratos, nenhuma foi encontrada entre as cepas isoladas.

4.1.2.3. Fermentação e oxidação de carboidratos

A glicose não foi fermentada nem oxidada por nenhuma das cepas classificadas. Todos os campilobacteres cresceram no meio para verificação da reação oxidativa, apresentando uma reação ligeiramente alcalina. Entretanto, somente 7 cepas de campilobacteres apresentaram crescimento no meio para verificação da fermentação (5 delas pertenciam às carcaças de suínos e 2 às de frangos).

4.1.2.4. Produção de sulfeto de hidrogênio

Todas as cepas de campilobacteres produziram sulfeto de hidrogênio em meio sensível. Em meio padrão (meio basal sem cisteína), com exceção das cepas F 24, F 25, F 26 e F 28 isoladas de frangos, todas as outras produziram o gás.

A maioria das cepas isoladas de suínos são de C. coli (STICHT-GROH, 1982 e BLASER, 1982), tipicamente mais produtoras de sulfeto de hidrogênio em meio padrão, que as de C. jejuni (SKIRROW & BENJAMIN, 1980a), mais frequentemente encontradas em frangos (BLASER, 1982).

Nenhuma das cepas de campilobacter constantes nos Quadros 4 e 5 produziu sulfeto de hidrogênio em meio de tríplice açúcar e ferro. Entretanto, a amostra S 38 de carcaça suína apresentou uma colônia de campilobacter cuja cepa produziu o sulfeto de hidrogênio em tríplice açúcar e ferro. É provável que esta cepa de campilobacter, produtora de catalase e sulfeto de hidrogênio em TAF, seja o C. fecalis, embora a morfologia celular não correspondesse àquela relatada por AL-MASHAT & TAYLOR (1980 a,b).

4.1.2.5. Crescimento em ágar nutriente simples

Segundo KING (1962) e ULLMANN (1979) os campilobateres são relativamente exigentes quanto ao meio de cultura. A ausência de crescimento dos campilobacteres isolados em meio de ágar nutriente simples (Quadros 4 e 5) indica que os organismos possuem exigências nutricionais mais complexas.

4.1.2.6. Crescimento em glicina, cloreto e glicose

Todos os campilobacteres isolados cresceram em meio basal com 1,0% de glicina, mas nenhum cresceu em meio basal com 3,5% de cloreto de sódio (Quadros 4 e 5). Com relação a estes testes, os campilobacteres isolados comportaram-se como os campilobacteres "relacionados" de KING (1957) ou Campylobacter fetus sub-espécie jejuni de SMIBERT (1974).

Em glicose a 8%, os campilobacteres isolados apresentaram sensibilidade ao carboidrato nesta concentração, com exceção das cepas F 26, F 27, F 28, S 6 e S 7 (Quadros 4 e 5). SKIRROW & BENJAMIN (1980a) não recomendam o emprego deste teste para diferenciar o C. jejuni dos outros campilobacteres produtores de catalase, devido à obtenção de resultados variáveis.

4.1.2.7. Crescimento às temperaturas de 25°C, 37°C e 42°C

Todas as cepas isoladas apresentaram crescimento às temperaturas de 37 e 42°C, mas nenhuma cresceu a 25°C (Quadros 4 e 5). Nos resultados são semelhantes àqueles relatados por KING (1962) e FLETCHER & PLASTRIDGE (1964b), para campilobacteres intestinais de seres humanos e animais, que demonstram o crescimento dos microrganismos a 42°C e a 37°C, mas não a 25°C.

4.1.2.8. Crescimento em aerobiose, micro-aerobiose e anaerobiose

Os campilobacteres isolados de frangos não cresceram em atmosfera aeróbia, mas apresentavam um crescimento escasso quando em anaerobiose (Quadro 4).

Por outro lado, as cepas isoladas de suíno foram mais anaeróbias que as de frangos (Quadro 5) e, no entanto, as cepas S 38 e S 39 esboçaram um ligeiro crescimento em aerobiose. Este comportamento variável de algumas cepas de campilobacteres de suínos em atmosfera anaeróbia e aeróbia também foi observado por VÉRON & CHATELAIN (1973) e SMIBERT (1974)

Todos os campilobacteres cresceram bem em atmosfera micro-aeróbia, mas ao isolamento inicial algumas cepas exigiram uma incubação de 72 horas para formarem colônias. A natureza micro-aeróbia dos organismos isolados ficou claramente estabelecida, refletindo fielmente as observações de muitos outros pesquisadores (SMIBERT, 1974; KING, 1962 e LUECHTEFELD et al., 1982)

4.1.2.9. Sensibilidade ao ácido nalidíxico, cloreto de trifeniltetrazolium e verde brilhante

Todas^{as} cepas isoladas apresentaram sensibilidade a 30 ug de ácido nalidíxico, com um diâmetro de zona de inibição situada numa faixa de 10 até 24 mm (Quadros 4 e 5).

Todos os campilobacteres isolados pertencem à sub-espécie jejuni de acordo com a sensibilidade apresentada frente ao ácido nalidíxico. Embora existam relatos sobre a existência de cepas de campilobacteres termotolerantes resistentes ao ácido nalidíxico (SKIRROW & BENJAMIN, 1980a), nenhuma foi encontrada entre as cepas por nós isoladas.

Somente uma cepa de campilobacter, a F 4, isolada de frango, cresceu e reduziu o cloreto de trifeniltetrazolium a 1,0 mg por mililitro de meio. Por outro lado, somente 1 cepa de campilobacter

isolada de suíno, a S 7, não reduziu o corante, a essa concentra-
ção.

Embora todas as cepas isoladas crescessem em 400 ug de trife-
niltetrazolium por mililitro de meio, sendo portanto C. fetus sub-
espécie jejuni, (SKIRROW & BENJAMIN, 1980a; LUECHTEFELD & WANG,
1982), a ausência de crescimento em 1,0 mg de CTT por mililitro de
meio constituiu a principal característica diferencial da maioria
das cepas isoladas. Baseado neste fato (Quadros 4 e 5), com exce-
ção da cepa F 4, as outras cepas isoladas de frangos e a cepa S 7
de suíno correspondem ao C. jejuni. Do mesmo modo é provável que
as cepas S 5, S 6 e S 21 isoladas de suínos correspondam ao C. je-
juni, visto que apresentaram apenas ligeiro crescimento no último
meio (VÉRON & CHATELAIN, 1973). Por outro lado, as outras cepas
originadas de suínos são representadas pelo C. coli, todas resis-
tentes à concentração de 1 mg de CTT por mililitro de meio. Este
fato pode ser compreendido lembrando-se as observações de LUECHTEFELD
& WANG (1982) que relatam que as cepas de C. fetus sub-espécie je-
juni (C. jejuni porque possuíam atividade hipuricase) isoladas de
homem e animais, 82% apresentaram susceptibilidade a 1,0 mg de CTT/
ml.

Quanto ao crescimento em verde brilhante, somente uma cepa
isolada de frango, a F 4, e uma cepa de suíno, a S 23, cresceram à
mais baixa concentração do agente inibidor (10 ug / ml). Entretan-
to, à mais alta concentração do corante nenhuma cepa apresentou
crescimento (30 ug / ml).

A exemplo do que foi relatado para C. coli e C. jejuni (VÉRON
& CHATELAIN, 1973), nenhum campilobacter isolado em nosso estudo
cresceu na presença de verde brilhante à concentração de 30 ug/ml.
Entretanto, contrariamente à opinião de ELAZHARY (1965), somente

uma cepa de C. fetus sub-espécie jejuni de frango e uma de suíno cresceram em meio contendo verde brilhante a mais baixa concentração (10 ug/ml). Este fato, associado às observações de SKIRROW & BENJAMIN (1980a), não nos permitiu diferenciar as prováveis cepas de C. coli e C. jejuni, porventura presentes entre aquelas isoladas de suínos.

As características morfológicas, culturais, bioquímicas, fisiológicas e de sensibilidade dos campilobacteres isolados das carcaças de suínos e frangos correspondem àquelas descritas para o C. fetus sub-espécie jejuni de SMIBERT (1974).

Dos testes efetuados para diferenciação das cepas isoladas, o teste de sensibilidade a 1,0 mg de cloreto de trifeniltetrazolium' por ml de meio foi o que apresentou resultados mais consistentes com base neste teste, 95% das cepas isoladas de frangos e 7% das cepas isoladas de suínos assemelham-se ao C. jejuni, 21% das isoladas de suínos apresentaram características intermediárias entre o C. jejuni e C. coli.

4.2. Do exame das carcaças

4.2.1. Carcaças de frangos

O C. fetus sub-espécie jejuni ocorre em frequência elevada no trato intestinal e fezes de animais de abate. Em decorrência, as carcaças podem ser contaminadas durante as operações de abate. Ainda, a contaminação cruzada pode ocorrer durante o pré-resfriamento das carcaças de frangos (SKIRROW, 1977). Portanto, o nível de contaminação das carcaças dependerá do número de microrganismos pre

sentes nas fezes, bem como das condições higiênico-sanitárias dos abatedouros, do mesmo modo como ocorre com as salmonelas.

Examinando o Quadro 6, verifica-se que foram isoladas 33 cepas de C. fetus sub-espécie jejuni de um total de 120 amostras de carcaças de animais de abate.

As carcaças de frangos foram as que apresentaram maior número de amostras positivas, num total de 19 (47,5%) isolamentos, seguida das carcaças suínas com 14 (35,5%) isolamentos. Das amostras provenientes da espécie bovina, nenhum campilobacter foi isolado.

De acordo com os dados do Quadro 7 sobre as contagens de C. fetus sub-espécie jejuni em 19 carcaças de frangos, verificamos que a maior densidade encontrada foi de $1,7 \times 10^2$ microrganismos por cm^2 de superfície analisada.

Os nossos resultados indicam que a ocorrência de C. fetus sub-espécie jejuni nas carcaças de frangos é semelhante àquela (45%) relatada por SHANKER et al. (1982), por cultivo direto sobre placas de Petri, para análise de carcaças de frangos inteiras e visceradas. É bom frisar que o abate desses frangos foi efetuado em operações idênticas àquelas do nosso estudo.

Verificamos ainda que a ocorrência do microrganismo nas carcaças de frangos, que nós pesquisamos, era inferior àquela relatada por PARK et al. (1981), no Canadá e EUA; por BRUCE et al. (1977), na Inglaterra; bem como àquela obtida nos EUA e Nova Zelândia, por SMELTZER (1981). Por outro lado, é necessário ressaltar que PARK et al. (1981) e SMELTZER (1981) analisaram carcaças inteiras, empregando procedimento de enriquecimento, filtração em membranas e posterior cultivo em meios seletivos. Entretanto, PARK et al. (1981), ao empregarem o plaqueamento direto para isolamento do C.

fetus sub-espécie jejuni das mesmas amostras, obtiveram resultados mais baixos que aqueles encontrados na nossa pesquisa.

A ocorrência de C. fetus sub-espécie jejuni em carcaças de frangos situa-se na faixa de 1,8 a 94,0%. (DOYLE, 1981; SMELTZER, 1981). Isto porque as técnicas utilizadas para colheita e tratamento das amostras, bem como a metodologia de isolamento, têm variado amplamente, podendo explicar os diferentes resultados já mencionados.

Os valores obtidos nas contagens de C. fetus sub-espécie jejuni em carcaças de frangos foram de modo geral baixos, possivelmente porque a técnica de amostragem (PATTERSON, 1971; GIL & HARRIS, 1982) e o meio empregado para isolamento apresentam limitações (GIL & HARRIS, 1982; MEHLMAN & ROMERO, 1982; PATTERSON, 1981), não revelando a contaminação real das amostras.

A presença de C. fetus sub-espécie jejuni em carcaças de frangos pode constituir-se em risco potencial à saúde pública, devido ao isolamento desse microrganismo em vários casos de enterite humana e à existência de relatos associando esta doença ao contato e ingestão de frangos mal cozidos ou outros alimentos que de alguma forma se contaminaram direta ou indiretamente com carcaças de frangos contendo o microrganismo.

4.2.2. Carcaças de suínos

Analisando o Quadro 8 podemos observar que, do total de 14 casos positivos de isolamento de suínos, o maior número encontrado foi de $4,9 \times 10$ C. fetus sub-espécie jejuni por cm^2 de superfície

analisada.

Nessas carcaças a ocorrência de contaminação com o C. fetus sub-espécie jejuni apresentou percentual semelhante ao encontrado por STERN (1981) nos EUA, que utilizou a mesma técnica de amostragem, porém em área um pouco maior (49,2 cm²) que a nossa, sobre o músculo semi-membranoso, nas adjacências do fêmur, mas as carcaças foram analisadas antes da lavagem final, ao contrário do que ocorreu com as nossas análises.

De modo geral, as contagens foram baixas, mas as mesmas considerações relacionadas às carcaças de frangos também se aplicam às de suínos.

Como a maioria das cepas isoladas de suínos assemelham-se ao C. coli e as de frangos ao C. jejuni, é provável que as carcaças de frangos possam vir a desempenhar papel mais importante como fonte de enterite humana por Campylobacter, principalmente por ser o C. jejuni mais frequentemente envolvido em surtos de enterite.

4.2.3. Carcaças de bovinos

Quanto aos bovinos, não foram encontradas amostras positivas nos dois matadouros, embora em um deles, que fazia primeiro matança de suínos e depois desta, no mesmo local e dia, matança de bovinos, encontramos o microrganismo nas carcaças de suínos. Do mesmo modo, STERN (1981) analisou 58 amostras de carcaças frescas de bovinos sem sofrerem a lavagem final e somente encontrou o microrganismo em uma amostra. Este autor também tentou isolar o microrganismo das fezes dos mesmos bovinos e não encontrou nenhum nas 31

amostras analisadas.

O resultado de STERN (1981), anteriormente mencionado, foi obtido quando o autor analisou carcaças sem sofrerem lavagem final em áreas maiores que as nossas (130 cm²) e utilizando zaragatoas que se desfazem durante a homogeneização das amostras, portanto em condições de obter melhores recuperações.

QUADRO 4 - COMPORTAMENTO MORFOLÓGICO, CULTURAL, BIOQUÍMICO, FISIOLÓGICO E DE SENSIBILIDADE DAS CEPAS DE C. fetus ssp. jejuni ISOLADAS DE CARCAÇAS DE FRANGOS.

Amostras	Testes	PRODUÇÃO DE										CRESCIMENTO						SENSIBILIDADE (e)							
		Motilidade	Formas cocóides	Catalase	Oxidase	Glicose O/F	Redução de nitrito	Meio sensível (a) H_2S	Meio padrão (b)	Meio TAF (c)	ANS (d)	Glicina 1%	NaCl 3,5%	Glicose 8%	25°C	37°C	42°C	Aerobiose	Micro-aerobiose	Anaerobiose	Ac. nalidixico 30 mg	CTT 0,4 mg/ml	CTT 1,0 mg/ml	V. brilhante 10,0 µg/ml	V. brilhante 30,0 µg/ml
F 4		+	+	+	+	N/N	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	S	+	+	+	+
F 5		+	+	+	+	B/-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	S	+	+	+	+
F 6		+	+	+	+	B/-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	S	+	+	+	+
F 7		+	+	+	+	N/-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	S	+	+	+	+
F 8		+	+	+	+	N/-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	S	+	+	+	+
F 9		+	+	+	+	B/-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	S	+	+	+	+
F 22		+	+	+	+	B/N	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	S	+	+	+	+
F 23		+	+	+	+	N/-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	S	+	+	+	+
F 24		+	+	+	+	B/-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	S	+	+	+	+
F 25		+	+	+	+	B/-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	S	+	+	+	+
F 26		+	+	+	+	N/-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	S	+	+	+	+
F 27		+	+	+	+	N/-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	S	+	+	+	+
F 28		+	+	+	+	N/-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	S	+	+	+	+
F 29		+	+	+	+	B/-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	S	+	+	+	+
F 30		+	+	+	+	N/-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	S	+	+	+	+
F 35		+	+	+	+	N/-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	S	+	+	+	+
F 37		+	+	+	+	B/-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	S	+	+	+	+
F 38		+	+	+	+	N/-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	S	+	+	+	+
F 40		+	+	+	+	B/-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	S	+	+	+	+

QUADRO 5 - COMPORTAMENTO MORFOLÓGICO, CULTURAL, BÍOQUÍMICO, FISIOLÓGICO E DE SENSIBILIDADE DAS CEPAS DE C. fetus ssp. jejuni ISOLADAS DE CARCAÇAS DE SUÍNOS.

Amostras	Testes	PRODUÇÃO DE H ₂ S						CRESCIMENTO						SENSIBILIDADE											
		Motilidade	Formas cocóides	Catalase	Oxidase	Glicose O/F	Redução de nitrito	Meio sensível (a)	Meio padrão (b)	Meio TAF (c)	ANS (d)	Glicina 1%	NaCl 3,5%	Glicose 8%	25°C	37°C	42°C	Aerobiose	Microaerobiose	Anaerobiose	Ac. Nalidíxico 30 mg.	CTT 0,4 mg/ml (e)	CTT 1,0 mg/ml	V. brilhante 10,0 µg/ml	V. brilhante 30,0 µg/ml
S 5		+	+	+	+	N/-	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	S	+	f	-	-	
S 6		+	+	+	+	B/-	+	+	-	-	+	-	f	-	+	+	-	-	+	+	S	+	f	-	-
S 7		+	+	+	+	N/-	+	+	-	-	+	-	f	-	+	+	-	-	+	+	S	+	-	-	-
S 19		+	+	+	+	B/N	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	S	+	+	-	-	-
S 20		+	+	+	+	N/N	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	S	+	+	-	-	-
S 21		+	+	+	+	N/N	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	f	S	+	f	-	-	-
S 22		+	+	+	+	N/N	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	S	+	+	-	-	-
S 23		+	+	+	+	N/-	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	S	+	+	+	-	-
S 35		+	+	+	+	N/N	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	f	S	+	+	-	-	-
S 36		+	+	+	+	N/-	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	S	+	+	-	-	-
S 37		+	+	+	+	N/-	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	S	+	+	-	-	-
S 38		+	+	+	+	N/-	+	+	**	-	+	-	-	+	+	f	+	+	S	+	+	-	-	-	-
S 39		+	+	+	+	B/-	+	+	-	-	+	-	-	+	+	f	+	+	S	+	+	-	-	-	-
S 40		+	+	+	+	N/-	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	S	+	+	-	-	-

(O/F): Oxidação /fermentação

(S): Sensível

(a): Meio Albimi com cisteína

(b): Meio Albimi sem cisteína

(c): Meio triplice açúcar e ferro

(d): Ágar nutriente simples

(e): Cloreto de trifeniltetrazolium

(f): Reação ou crescimento fracamente positivos

(-): Reação ou crescimento negativos

(+): Reação ou crescimento positivos

(N): Reação neutra

(B): Reação básica

(*): Uma colônia desta amostra não produziu catalase

(**): Uma colônia desta amostra produziu H₂S.

QUADRO 6 - C. fetus ssp. jejuni EM 120 CARCAÇAS FRESCAS DE ANIMAIS DE ABATE.

Animal analisado	Nº de isolamentos em 40 amostras de carcaças	%
FRANGOS	19	47,5
SUÍNOS	14	35,3
BOVINOS	00	00,0

QUADRO 7 - CONTAGENS DE C. fetus ssp. jejuni EM CARCAÇAS
DE FRANGOS.

Amostras	Contagem/cm ²
F 4	4,0 x 10
F 5	6,3 x 10
F 6	4,6 x 10
F 7	8,0 x 10
F 8	1,1 x 10 ²
F 9	1,7 x 10 ²
F 22	0,6 x 10
F 23	1,3 x 10
F 24	1,6 x 10
F 25	2,6 x 10
F 26	3,7 x 10
F 27	2,2 x 10
F 28	2,6 x 10
F 29	4,4 x 10
F 30	1,6 x 10
F 35	3,7 x 10
F 37	2,4 x 10
F 38	5,4 x 10
F 40	1,1 x 10

QUADRO 8 - CONTAGENS DE C. fetus ssp. jejuni EM CARCAÇAS
DE SUÍNOS.

Amostras	Contagem/cm ²
S 5	0,7 x 10
S 6	2,2 x 10
S 7	0,3 x 10
S 19	1,2 x 10
S 20	0,4 x 10
S 21	0,8 x 10
S 22	0,4 x 10
S 23	0,1 x 10
S 35	4,9 x 10
S 36	2,3 x 10
S 37	0,2 x 10
S 38	0,6 x 10
S 39	3,8 x 10
S 40	2,1 x 10

5. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados de nossa pesquisa chegamos às seguintes conclusões:

5.1. A ocorrência de Campylobacter fetus sub-espécie jejuni foi constatada em carcaças de frangos e suínos. O microrganismo não foi encontrado nas carcaças de bovinos.

5.2. As carcaças de frangos apresentaram taxas de ocorrência e contagens médias de C. fetus sub-espécie jejuni mais elevadas que as de suínos, mas mesmo assim bastante baixas.

5.3. Dos testes bioquímicos efetuados para caracterização das cepas de Campylobacter fetus sub-espécie jejuni isoladas de carcaças de frangos e suínos, somente a tolerância a 1,0 mg de cloreto de trifeniltetrazolium por ml de meio e, em menor extensão, a produção de sulfeto de hidrogênio em meio padrão, permitiram uma diferenciação da maioria das cepas. Com base nestes testes, a maioria das cepas isoladas de frangos assemelham-se ao C. jejuni e as de suínos ao C. coli.

5.4. Embora a média geral das contagens tenha sido muito baixa não devemos subestimá-la, particularmente, por não conhecermos ainda, o número mínimo de organismos necessário a instalação de uma infecção humana.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALLSUP, T. N. & HUNTER, D. - The isolation of vibrios from diseased and healthy calves: Part 1: Laboratory. Vet. Rec., 93: 389 - 392, 1973.
2. AL-MASHAT, R. R. & TAYLOR, D. J. - Campylobacter spp in enteric lesions in cattle. Vet. Rec., 107: 31 - 34, 1980a.
3. AL-MASHAT, R. R. & TAYLOR, D. J. - Production of diarrhoea and dysentery in experimental calves by feeding pure cultures of Campylobacter fetus subspecie jejuni. Vet. Rec., 107: 459 - 464, 1980b.
4. AL-MASHAT, R. R. & TAYLOR, D. J. - Production of enteritis in calves by the oral inoculation of pure cultures of Campylobacter fecalis. Vet. Rec., 109: 97 - 101, 1981.
5. ANDRESS, C. E. & BARNUM, D. A. - Pathogenicity of Vibrio coli for swine. II. Experimental infection of conventional pigs with V. coli. Can. J. Comp. Med. and Vet. Sci., 32: 529 - 532, 1968.
6. ATHERTON, J. G. & RICKETTS, S. W. - Campylobacter infection from foals. Vet. Rec., 107: 264 - 265, 1980.
7. BERG, R. L.; JUTILA, J. W. & FIREHAMER, B. D. - A revised classification of Vibrio fetus. Am. J. Vet. Res., 32: 11 - 20, 1971.
8. BLANKENSHIP, L. C. & CRAVEN, S. E. - Survival response of Campylobacter fetus ss jejuni to temperatures between 49°C and 57°C in chicken meat. In: 81st Ann. Meet. Am. Soc.

Microbiol. Dallas, Texas, 1981. P12, p. 197.

9. BLASER, M. J. - Campylobacter fetus subspecies jejuni: The need for surveillance. J. Infect. Dis., 141: 670 - 671, 1980.
10. BLASER, M. J. - Campylobacter jejuni and food. Food Technol., 36: 89 - 92, 1982.
11. BLASER, M. J.; BERKOWITZ, I. D.; La FORCE, F. M.; CRAVENS, J.; RELLER, L. B. & WANG, W. L. - Campylobacter enteritis: Clinical and epidemiologic features. Ann. Intern. Med., 91: 179 - 185, 1979a.
12. BLASER, M. J.; CHECKO, P.; BOPP, C. & HUGHES, J. - Foodborne Campylobacter enteritis. In: 81st Ann. Meet. Am. Soc. for Microbiol. Dallas, Texas, 1981. C12, p. 264.
13. BLASER, M. J.; CRAVENS, J.; POWERS, B. W.; La FORCE, F. M. & WANG, W. L. - Campylobacter enteritis associated with unpasteurized milk. Am. J. Med., 67: 715 - 718, 1979b.
14. BLASER, M. J.; CRAVENS, J.; POWERS, B. W. & WANG, W. L. - Campylobacter enteritis associated with canine infection. Lancet, 2: 979 - 981, 1978.
15. BLASER, M. J.; GLASS, R. I.; HUQ, M. I.; STOLL, B.; KIBRIYA, G. M. & ALIM, A. R. M. A. - Isolation of Campylobacter fetus subsp. jejuni from Bangladeshi children. J. Clin. Microbiol., 12: 744 - 747, 1980b.
16. BLASER, M. J.; HARDESTY, H. L.; POWERS, B. & WANG, W. L. - Survival of Campylobacter fetus subsp. jejuni in Biological milieus. J. Clin. Microbiol., 11: 309 - 313, 1980a.

17. BLASER, M. J.; HARDESTY, H. L. & WANG, W. L. - Campylobacter enteritis in a household - Colorado. Epidemiologic Notes and Reports. Morbid. Mortal. Wkly. Rep., 28: 273 - 274, 1979c.
18. BLASER, M. J.; La FORCE, F. M.; WILSON, N. A. & WANG, W. L. - Reservoirs for human Campylobacteriosis. J. Infect. Dis., 141: 665 - 669, 1980c.
19. BLASER, M. J.; PARSONS, R. B. & WANG, W. L. - Acute colitis caused by Campylobacter fetus ss. jejuni. Gastroenterol., 78: 448 - 453, 1980d.
20. BOKKENHEUSER, V.; RICHARDSON, N. J.; BRYNER, J. H.; ROUX, D. J.; SCHUTTE, A. B.; KOORNOHOF, H. J.; FREIMAN, I. & HARTMAN, E. - Detection of enteric campylobacteriosis in children. J. Clin. Microbiol., 9: 227 - 232, 1979.
21. BOLEY, L. E.; WOODS, G. T.; HATCH, R. D. & GRAHAM, R. - Studies on porcine enteritis. Cornell Vet., 41: 231 - 235, 1951.
22. BORDER, M. M.; FIREHAMMER, B. D. & MYERS, L. L. - Tube culture method for viable counts of Campylobacter fetus (Vibrio fetus). Appl. Microbiol., 28: 730 - 732, 1974.
23. BROUWER, R.; MERTENS, M. J. A.; SIEM, T. H. & KATCHAKI, J. - An explosive outbreak of Campylobacter enteritis in soldiers. Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol., 45: 517 - 519, 1979.
24. BRUCE, D.; ZOCHOWSKI, W. & FERGUSON, I. R. - Campylobacter enteritis. Br. Med. J., 2: 1219, 1977.
25. BRYANS, J. T. & SMITH, A. G. - Physiological properties of

pathogenic and nonpathogenic Vibrio species isolated from cattle, sheep and chickens. Cornell Vet., 50: 331 - 338, 1960.

26. BRYNER, J. H. & FRANK, A. H. - A preliminary report on the identification of Vibrio fetus. Am. J. Vet. Res., 16: 76 - 78, 1955.
27. BRYNER, J. H.; FRANK, A. H. & O'BERRY, P. A. - Dissociation studies of vibrios from the bovine genital tract. Am. J. Vet. Res., 23: 32 - 41, 1962.
28. BRYNER, J. H.; O'BERRY, P. A.; ESTES, P. C. & FOLEY, J. W. - Studies of vibrios from gallbladder of market sheep and cattle. Am. J. Vet. Res., 33: 1439 - 1444, 1972.
29. BUCK, G. E. & KELLY, M. T. - Effect of moisture content of the medium on colony morphology of Campylobacter fetus subsp. jejuni. J. Clin. Microbiol., 14: 585 - 586, 1981.
30. BUTZLER, J. P.; DEKEYSER, P.; DETRAIN, M. & DEHAEN, F. - Related vibrio in stools. J. Pediatr., 82: 493 - 495, 1973.
31. BUTZLER, J. P. & SKIRROW, M. B. - Campylobacter enteritis. Clin. Gastroenterol., 8: 737 - 765, 1979.
32. CADRANEL, S.; RODESCH, P.; BUTZLER, J. P. & DEKEYSER, P. - Enteritis due to "related vibrio" in children. Am. J. of Dis. in Childhood, 126: 152 - 155, 1973.
33. CHAN, F. T. H. & MACKENZIE, A. M. R. - Enrichment medium and control system for isolation of Campylobacter fetus subsp. jejuni from stools. J. Clin. Microbiol., 15: 12 - 15, 1982.
34. CHESTER, B. & POULOS, E. G. - Rapid presuntive identification

- of vibrios by immobilization in distilled water. J. Clin. Microbiol., 11: 537 - 539, 1980.
35. CHRISTOPHER, F. M.; SMITH, G. C. & VANDERZANT, C. - Effect of temperature and pH on the survival of Campylobacter fetus¹. J. Food Prot., 45: 253 - 259, 1982a.
36. CHRISTOPHER, F. M.; SMITH, G. C. & VANDERZANT, C. - Examination on poultry giblets, raw milk and meat for Campylobacter fetus subsp. jejuni. J. Food Prot., 45: 260 - 262, 1982b.
37. CISNEROS, R. L.; ONDERDONK, A. B.; BRONSON, R. & SHEGAL, P. - Association of inflammatory bowel disease in a colony of cotton top marmosets with the presence of Campylobacter fetus subsp. jejuni. In: 81st Ann. Meet. Am. Soc. Microbiol. Dallas, Texas, 1981. B57, p.24.
38. DEAS, D. W. - Observations on swine dysentery and associated vibrios. Vet. Rec., 72: 65 - 68, 1960.
39. DEKEYSER, P.; GOSSUIN-DETRAIN, M; BUTZLER, J. P. & STERNON, J. - Acute enteritis due to related vibrio: First positive stool cultures. J. Infect. Dis., 125: 390 - 392, 1972.
40. DELORME, L.; LAMBERT, T.; BRANGER, C. & ACAR, J. F. - Enteritis due to Campylobacter jejuni in the Paris area. Medecine et Maladies Infectieuses, 9: 675, 1979.
41. De MOL, P. & BOSMANS, E. - Campylobacter enteritis in Central Africa. Lancet, 1: 604 - 605, 1978.
42. DILIELLO, L. R.; POELMA, L. J. & FABER, J. E. - Biochemical and serological separation of some members of the genus Vibrio.

Am. J. Res., 20: 532 - 536, 1959.

43. DISEASE SURVEILLANCE CENTRE & COMMUNICABLE DISEASE (Scotland) UNIT - Campylobacter infections in Britain. Brit. Med. J., 1: 1357, 1978.
44. DOYLE, L. P. - A vibrio associated with swine dysentery. Am. J. Vet. Res., 5: 3 - 5, 1944.
45. DOYLE, L. P. - The etiology of swine dysentery. Am. J. Vet. Res., 9: 50 - 51, 1948.
46. DOYLE, M. P. - Campylobacter fetus subsp. jejuni: An old pathogen of new concern. J. Food Prot., 44: 480 - 488, 1981.
47. DOYLE, M. P. & ROMAN, D. J. - Growth and survival of Campylobacter fetus subsp. jejuni as a function of temperature and pH. J. Food Prot., 44: 596 - 601, 1981.
48. DOYLE, M. P. & ROMAN, D. J. - Response of Campylobacter jejuni to sodium chloride. Applied and Environmental Microbiology, 43: 561 - 565, 1982a.
49. DOYLE, M. P. & ROMAN, D. J. - Sensitivity of Campylobacter jejuni to drying. J. of Food Prot., 45: 507 - 510, 1982b.
50. DOYLE, M. P. & ROMAN, D. J. - Recovery of Campylobacter jejuni and Campylobacter coli from inoculated foods by selective enrichment. Appl. and Environ. Microbiol., 45: 1343 - 1353, 1982c.
51. ELAZHARY, M. A. S. Y. - An assay of isolation and differential identification of some animal vibrios and of elucidation of their pathological significance. Meed. Veeartsenijsch.

Rijksuniv. Gent., 12: 1 - 80, 1968.

52. FERNANDEZ, H.; TOLEDO, M. R. F.; FAGUNDES NETO, U. & TRABULSI, L. R. - Isolamento de Campylobacter fetus ssp. jejuni em crianças da cidade de São Paulo. In: 34ª Reunião Ann. Soc. Bras. Progr. Ciên. Campinas, S.P., julho 1982. 12G 1.3 , p. 645.
53. FERNIE, D. S.; GRIFFIN, R. M. & PARK, R. W. A. - The possibility that Campylobacter (Vibrio) coli and Treponema hyodysenteriae are both involved in swine dysentery. Br. Vet. J., 131: 335 - 338, 1975.
54. FERNIE, D. S. & PARK, R. W. A. - The isolation and nature of campylobacters (microaerophilic vibrios) from laboratory and wild rodents. J. Med. Microbiol., 10: 325 - 329, 1977.
55. FERREIRA, M. C. S.; RIBEIRO, V. L. S. & RICCIARD, I.D. - Campylobacter, dogs and human enteritis. Vet. Rec., 106: 451, 1979.
56. FIREHAMMER, B. D. - The isolation of vibrios from ovine feces. Cornell Vet., 55: 483 - 494, 1965.
57. FIREHAMMER, B. D. & BERG, R. L. - The use of temperature tolerance in the identification of Vibrio fetus. Am. J. Vet. Res., 26: 995 - 997, 1965.
58. FIREHAMMER, B. D.; MARSH, H. & TUNNICLIFF, E. A. - The role of the ram in vibriosis of sheep. Am. J. Vet. Res., 17: 573 - 581, 1956.
59. FIREHAMMER, B. D. & MYERS, L. L. - Campylobacter fetus subsp. jejuni: Its possible significance in enteric disease of calves and lambs. Am. J. Res., 42: 918 - 922, 1981.

60. FLETCHER, R. D. & PLASTRIDGE, W. N. - Effect of gases on vibrios.
J. Bacteriol., 87: 352 - 355, 1964a.
61. FLETCHER, R. D. & PLASTRIDGE, W. N. - Difference in physiology
of Vibrio spp from chickens and man. Avian Dis., 8: 72 -
75, 1964b.
62. FLORENT, A. - Isolement d'un vibrio saprophyte du sperme du
taureau et du vagin de la vache (Vibrio bubulus). Comp.
Rend. Soc. Biol., 147: 2066 - 2069, 1953.
63. FLORENT, A. - Les deux vibriosis génitales: La vibriose
vénérienne due   V. Fetus venerialis et la vibriose d'origine
intestinale   V. Fetus intestinales. Meed. der Veeart. van
de Rijksun. te Gent, 3: 5 - 45, 1959.
64. GARVIE, E. I. - Preservation of Vibrio fetus by freeze drying.
J. Appl. Bact., 30: 255 - 260, 1967.
65. GEORGE, H. A.; HOFFMAN, P.S.; SMIBERT, R. M. & KRIEG, N. R. -
Improved media for growth and aerotolerance of Campylo-
bacter fetus. J. of Clin. Microbiol., 8: 36 - 41, 1978.
66. GILCHRIST, M. J. R.; GREWEL, C. M. & WASHINGTON II, J. A. -
Evaluation of media for isolation of Campylobacter fetus
subsp. jejuni from fecal specimens. J. Clin. Microbiol.,
14: 393 - 395, 1981.
67. GILL, C. O. & HARRIS, L. M. - Survival and growth of Campylo-
bacter fetus subsp. jejuni on meat and in cooked foods.
Appl. and Environ. Microbiol., 44: 259 - 263, 1982.
68. GOREN, E. & JONG, W. A. - Campylobacter fetus subspecies jejuni
bij pluimvee. Tijdschr. Diergeneesk., 105: 725 - 726, 1980.

69. GRANT, I. H.; RICHARDSON, N. J. & BOKKENHEUSER, V. D. - Broiler chickens as potential source of Campylobacter infections in humans. J. of Clin. Microbiol., 11: 508 - 510, 1980.
70. HARVEY, S. M. - Hippurate hydrolysis by Campylobacter fetus. J. of Clin. Microbiol., 11: 435 - 437, 1980.
71. HAYEK, L. J. & CRUICKSHANK, J. G. - Campylobacter enteritis. Brit. Med. J., 2: 1219, 1977.
72. HOFFMAN, P. S.; GEORGE, H. A.; KRIEG, N. R. & SMIBERT, R. M. - Studies of the microaerophilic nature of Campylobacter fetus subsp. jejuni. II Role of exogenous superoxide anions and hydrogen peroxide. Can. J. Microbiol., 25: 8 - 16, 1979a.
73. HOFFMAN, P. S.; KRIEG, N. R. & SMIBERT, R. M. - Studies of the microaerophilic nature of Campylobacter fetus subsp. jejuni. I. Physiological aspects of enhanced aerotolerance. Canadian J. of Microbiol., 25: 1 - 7, 1979b.
74. HOLDEMAN, L. V.; CATO, E. P. & MOORE, E. C. - Anaerobe Laboratory Manual. Blacksburg, Virginia, V. P. I. Anaerobe Laboratory, 1977.
75. JAMES, H. D. & DOYLE, L. P. - Further studies with a vibrio as the etiologic agent of swine dysentery. J. Am. Med. Assoc., 111: 47, 1947.
76. JARAMILLO, H. F. - Efeito dos sobrenadantes de culturas de Campylobacter fetus subsp. jejuni sobre o transporte de sódio e glicose no jejuno de ratos perfundidos "in vivo". São Paulo, 1982 (Tese de Mestrado - Escola Paulista de Medicina).
77. JONES, D. M. & ROBINSON, D. A. - Occupational exposure to Campylo

- bacter jejuni infection. Lancet, 1: 440 - 441, 1981.
78. JONES, F. S.; ORCUTT, M. & LITTLE, R. B. - Vibrios (Vibrio jejuni, n. sp.) associated with intestinal disorders of cows and calves. J. Exp. Med., 53: 853 - 863, 1931.
79. KARMALI, M. A.; ALLEN, A. K. & FLEMING, P. C. - Differentiation of catalase positive Campylobacters with special reference to morphology. International J. Systematic Bacteriol., 31: 64 - 71, 1981.
80. KARMALI, M. A. & FLEMING, P. C. - Campylobacter enteritis in children. J. Pediatrics, 94: 527 - 533, 1979a.
81. KARMALI, M. A. & FLEMING, P. C. - Campylobacter enteritis. Can. Med. Assoc. J., 120: 1525 - 1532, 1979b.
82. KARMALI, M. A. & FLEMING, P. C. - Application of the Fortner principle to isolation of Campylobacter from Stools. J. Clin. Microbiol., 10: 245 - 247, 1979c.
83. KIGGINS, E. M. & PLASTRIDGE, W. N. - Effect of gaseous environment on growth and catalase content of Vibrio fetus cultures of bovine origin. J. Bacteriol., 72: 397 - 400, 1956.
84. KING, E. O. - Human infections with Vibrio fetus and a closely related vibrio. J. Infect. Dis., 101: 119 - 128, 1957.
85. KING, E. O. - The laboratory recognition of Vibrio fetus and a closely related Vibrio isolated from cases of human vibriosis. Annals of the New York Academy of Sci., 98: 700 - 711, 1962.
86. KINGSCOTE, B. - Use of catalase in the culture of Vibrio fetus.

Can. J. Microbiol., 7: 951 - 952, 1961.

87. KIRUBAKARAN, C.; DAVIDSON, G. P; DARBY, H.; HANSMAN, D.; MCKAY, G.; MOORE, B. & LEE, P. - Campylobacter as a cause of acute enteritis in children in South, Australia. I. A 12 - month study with controls. Med. J. Australia, 2: 333 - 335, 1981.
88. KUZDAS, C. D. & MORSE, E. V. - Physiological characteristics differentiating Vibrio fetus and others vibrios. Am. J. Vet. Res., 17: 331 - 336, 1956.
89. LANDER, K. P. & GILL, K. P. W. - Experimental infection of the bovine udder with Campylobacter coli/jejuni. J. Hyg. Camb., 84: 421 - 427, 1980.
90. LAUWERS, S.; BERGE, E.; NAESSENS, A. & BUTZLER, J. P. - Monkeys as a reservoir for Campylobacter jejuni. In: 81st Ann. Meet. Am. Soc. for Microbiol. Dallas, Texas, March, 1981. C217, p. 298.
91. LEAPER, S. & OWEN, R. J. - Identification of catalase producing Campylobacter species based on biochemical characteristics and on cellular fatty acid composition. Current Microbiol., 6: 31 - 35, 1981.
92. LECCE, J. G. - Some biochemical characteristic of Vibrio fetus and other related vibrios isolated from animals. J. Bact., 76: 312 - 316, 1958.
93. LEVI, A. J. - A gastroenteritis outbreak probably due to a bovine strain of vibrio. Yale J. Biol. Med., 18: 243 - 259, 1946.
94. LOESCHE, W. J.; GIBBONS, R. J. & SOCRANSKY, S. S. - Biochemical

- characteristics of Vibrio sputorum and relationship and Vibrio bubulus and Vibrio fetus. J. Bacteriol., 89: 1109 - 1116, 1965.
95. LOWRIE, D. B.; PEARCE, J. H. & KENNEDY, J. F. - The effect of osmotic variation upon the growth of Vibrio fetus. J. General Microbiol., 80: 541 - 548, 1974.
96. LUECHTEFELD, N. A. W.; BLASER, M. J.; RELLER, L. B. & WANG, W. L. - Isolation of Campylobacter fetus subsp. jejuni from migratory waterfowl. J. Clin. Microbiol., 12: 406 - 408, 1980.
97. LUECHTEFELD, N. W.; CAMBRE, R. C. & WANG, W. L. L. - Campylobacter fetus subsp. jejuni in zoo animals. In: 81st Ann. Meet. Am. Soc. Microbiol. Dallas, Tex., March, 1981a. C205,
98. LUECHTEFELD, N. W.; RELLER, L. B.; BLASER, M. J. & WANG, W. L. - Comparison of atmospheres of incubation for primary isolation of Campylobacter fetus subsp. jejuni from animal specimens: 5% oxygen versus candle jar. J. Clin. Microbiol., 15: 53 - 57, 1982.
99. LUECHTEFELD, N. W. & WANG, W. L. - Campylobacter fetus subsp. jejuni in a turkey processing plant. J. Clin. Microbiol., 13: 266 - 268, 1981.
100. LUECHTEFELD, N. W. & WANG, W. L. - Hippurate hydrolysis bay and triphenyltetrazolium tolerance of Campylobacter fetus. J. Clin. Microbiol., 15: 137 - 140, 1982.
101. LUECHTEFELD, N. W.; WANG, W. L.; BLASER, M. J. & RELLER, L. B. - Evaluation of transport and storage techniques for isolation of Campylobacter fetus subsp. jejuni from turkey cecal specimens. J. Clin. Microbiol., 13: 438 - 443, 1981b.

102. MAGALHÃES, M.; ANDRADE, M. A. & SILVA, G. P. da - Simple and inexpensive method for culturing Campylobacter fetus subsp. jejuni. Rev. Microbiol., 13: 124 - 125, 1982.
103. MEGRAUD, F. & LATRILLE, J. - Campylobacter jejuni en pathologie humaine. I. Aspects cliniques et thérapeutiques. Path. et Biol., 29: 245 - 253, 1981.
104. MEHLMAN, I. J. & ROMERO, A. - Improved growth medium for Campylobacter species. Appl. and Environ. Microbiol., 43: 615 - 618, 1982.
105. MENTZING, L. O. - Waterborne outbreaks of Campylobacter enteritis in central Sweden. Lancet, 2: 352 - 354, 1981.
106. MOHANTY, S. B.; PLUMER, G. J. & FABER, J. E. - Biochemical and colonial characteristics of some bovine vibrios. Am.J.Vet. Res., 23: 554 - 557, 1962.
107. MORRIS, J. A. & PARK, R. W. A. - The isolation of microaerophilic vibrios. In: SHAPTON, D. A. & BOARD, B.G. Isolation of Anaerobes. London Inc., Academic Press, 1971.
108. MORRIS, J. A. & PARK, R. W. A. - A comparison using gel electrophoresis of cell proteins of Campylobacters (Vibrios) associated with infertility, abortion and swine dysentery. J. General Microbiol., 78: 165 - 178, 1973.
109. MOSSEL, D. A. A. & QUEVEDO, F. - Control Microbiologico de los Alimentos. Lima, Serie de monografias del Cleiba, 1967.
110. NORBERG, P. - Enteropathogenic bacteria in frozen chicken. Appl. and Environ. Microbiol., 42: 32 - 34, 1981.

111. OOSTEROM, J. - Het voorkomen van Campylobacter fetus subspecies jejuni bij normale slachtvarkens. Tijdschr. Diergeneesk., 105: 49 - 50, 1980.
112. OOSTEROM, J.; BECKERS, H. J.; JANSEN, L. M. van N. & SCHOTHORST, M. van - Een explosie van Campylobacter-infectie in een kazerne, waarschijnlijk veroorzaakt door rauwe tartaar. Ned. T. Geneesk., 124: 1631 - 1634, 1980.
113. OOSTEROM, J.; VEREIJKEN, M. J. G. M. & ENGELS, G. B. - Campylobacter isolations. Vet. Qr., 3: 104, 1981.
114. PAI, C. H.; SORGER, S.; LACKMAN, L. & SINAI, R. E. - Campylobacter gastroenteritis in children. J. Pediatrics, 94: 589-591, 1979.
115. PARK, C. E. & STANKIEWICZ, Z. K. - Isolation of Campylobacter fetus ss jejuni from chicken. Meeting Can. Inst. Food Sci. and Technol. Alberta, Canada, 1978.
116. PARK, C. E.; STANKIEWICZ, Z. K.; LOVETT, J. & HUNT, J. - Incidence of Campylobacter jejuni in fresh eviscerated whole market chickens. Can. J. Microbiol., 27: 841 - 842, 1981.
117. PARK, C. H. - A simple method for maintaining fastidious organisms. Am. J. Clin. Pathol., 66: 927 - 928, 1976.
118. PATTERSON, J. T. - Microbiological assessment of surfaces. J. Food Technol., 6: 63 - 72, 1971.
119. PATTON, C. M.; MITCHELL, S. W.; POTTER, M. E. & KAUFMANN, A.F. - Comparison of selective media for primary isolation of Campylobacter fetus subsp. jejuni. J. Clin. Microbiol., 13: 326 - 330, 1981.

120. PECKHAM, M. C. - Avian vibrionic hepatitis. Avian Dis., 2:
348 - 358, 1958.
121. PEEL, R. N. & McINTOSH, A. W. - The dog it was that died. Lancet, 2: 1212, 1978.
122. PLASTRIDGE, W. N. & WILLIAMS, L. F. - Observations on Vibrio fetus infection in cattle. J. Am. Vet. Med. Assoc., 102:
89 - 95, 1943.
123. PLUMER, G. J.; DUVALL, W. C. & SHEPLER, U. M. - A preliminary report on a new technique for isolation of Vibrio fetus from carrier bulls. Cornell Vet., 22: 867, 1962.
124. PORTER, I. A. & REID, T. M. S. - A milk-borne outbreak of Campylobacter infection. J. Hyg. Camb., 84: 417 - 419, 1980.
125. PRESCOTT, J. F. & BRUIN-MOSCH, C. W. - Carriage of Campylobacter jejuni in healthy and diarrheic animals. Am. J. Vet. Res., 42: 164 - 165, 1981.
126. PRESCOTT, J.F. & MUNROE, D. L. - Campylobacter jejuni enteritis in man and domestic animals. JAVMA, 81: 1524 - 1530, 1982.
127. RAZI, M. H. H. & PARK, R. W. A. - Studies of media for the isolation and storage of Campylobacter spp. J. Appl. Bacteriol., 47: 1979.
128. RAZI, M. H. H.; PARK, R. W. A. & SKIRROW, M. B. - Two new tests for differentiating between strains of Campylobacter. J. Appl. Bacteriol., 50: 55 - 57, 1981.
129. RIBEIRO, C. D. - Campylobacter enteritis. Lancet, 2: 270-271, 1978.

130. RICCIARDI, I. D.; FERREIRA, M. C. S.; OTTO, S. S.; OLIVEIRA, N.; SABRÁ, A. & FONTES, C. F. - Thermophilic Campylobacter-associated diarrhoea in Rio de Janeiro. Rev. Bras. de Pesquisas Médicas e Biológicas, 12: 270 - 271, 1979.
131. RISTIC, M.; WHITE, F. S. & DOTY, R. B. - Morphological and serological characteristics of fresh isolates of Vibrio fetus and other vibrios inhabiting the bovine and ovine genital tracts. Am. J. Vet. Res., 19: 99 - 107, 1958.
132. ROBERTS, D. S. - Vibrionic dysentery in swine. The isolation of a vibrio from an outbreak in New South Wales. Aust. Vet. J., 32: 27 - 30, 1956.
133. ROBINSON, D. A. - Infective dose of Campylobacter jejuni in milk. Brit. Med. J., 282: 1584, 1981.
134. ROBINSON, D. A.; EDGAR, W. J.; GIBSON, G. L.; MATCHETT, A. A. & ROBERTSON, L. - Campylobacter enteritis associated with consumption of unpasteurised milk. Brit. Med. J., 1: 1171 - 1173, 1979.
135. ROBINSON, D. A. & JONES, D. M. - Milk-borne Campylobacter infection. Brit. Med. J., 282: 1374 - 1376, 1981.
136. SCHAEFER, J. R.; CONKLIN, E. V.; BUNCE, D. F. M.; STORCK, R. D.; ARNOLD, F. K.; VINER, J. P.; MERRITT, F. B.; KRISH, D.; ROTH, A. J.; DUBUQUE, M. P. H.; CURRIER, R. W.; WINTERMEYER, L. A. & DAVIS, J. P. - Campylobacter enteritis. Iowa. Morbid. Mortal. Wkly. Rep., 28: 565 - 566, 1979.
137. SCHNEIDER, D. W. & MORSE, E. V. - The growth and viability of Vibrio fetus and related vibrios in media containing ox bile.

Cornell Veterinarian, 45: 84 - 89, 1955.

138. SEBALD, M. & VÉRON, M. - Teneur en bases da l' ADN et classification des vibrions. Ann. Inst. Pasteur, 105: 897 - 910, 1963.
139. SERRANO, A. M. - Incidência de Clostridium perfringes em alimentos, um surto de intoxicação e evidenciação da prova de lecitinase. Campinas, 1976 (Tese de doutoramento - FEAA, Univ. Estadual de Campinas).
140. SHANKER, S.; ROSENFELD, J. A.; DAVEY, G. R. & SORREL, T. C. - Campylobacter jejuni: Incidence in processed broilers and biotype distribution in human and broiler isolates. Appl. and Environ. Microbiol., 43: 1219 - 1220, 1982.
141. SHEPPLER, V. M.; PLUMER, G. J. & FABER, J. E. - Isolation of Vibrio fetus from bovine preputial fluid, using millipore filters and an antibiotic medium. Am. J. Vet. Res., 24: 749 - 755, 1963.
142. SIMMONS, N. A. & GIBBS, F. J. - Campylobacter enteritis. Brit. Med. J., 23: 264, 1977.
143. SKERMAN, V. B. D.; MCGOWAN, V. & SNEATH, P. H. A. (ed.) - Approved Lists of bacteria names. International J. of Systematic Bacteriol., 30: 225 - 420, 1980.
144. SKIRROW, M. B. - Campylobacter enteritis: A "new" disease. Brit. Med. J., 2: 9 - 11, 1977.
145. SKIRROW, M. B. & BENJAMIN, J. - "1001" Campylobacters: cultural characteristics of intestinal campylobacters from man and animals. J. Hyg. Camb., 85: 427 - 442, 1980b.

146. SKIRROW, M. B. & BENJAMIN, J. - Differentiation of entero-pathogenic Campylobacter. J. Clin. Pathology, 33: 1122, 1980a.
147. SMELTZER, T. I. - Isolation of Campylobacter jejuni from poultry carcasses. Australian Vet. J., 57: 511 - 512, 1981.
148. SMIBERT, R. M. - Nutrition of Vibrio fetus. J. Bacteriol., 85: 394 - 398, 1963.
149. SMIBERT, R. M. - Vibrio fetus var. intestinalis isolated from fecal and intestinalis isolated from fecal and intestinal contents of clinically normal sheep: Isolation of Microaerophilic vibrios. Am. J. Vet. Res., 26: 315 - 319, 1965.
150. SMIBERT, R. M. - Vibrio fetus var. intestinalis isolated from the intestinal content of birds. Am. J. Vet. Res., 30: 1437 - 1442, 1969.
151. SMIBERT, R. M. - Campylobacter. In: R. E. BUCHANAN & N. E. GIBBONS (eds). Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 8th ed., Baltimore, Williams and Wilkins, 1974.
152. SMIBERT, R. M. - The genus Campylobacter. Ann.Rev.Microbiol., 32: 673 - 709, 1978.
153. SMITH, M. V. & MULDOON, P. J. - Campylobacter fetus subsp. jejuni (Vibrio fetus) from commercially processed poultry. Appl. Microbiol., 27: 995 - 996, 1974.
154. SMITH, T. - Spirilla associated with disease of the fetal membranes in cattle. J. Exp. Med., 28: 701 - 719, 1918.
155. SMITH, T. & TAYLOR, M. S. - Some morphological and biological

- characters of Spirilla (Vibrio fetus n.s.p.) associated with disease of fetal membranes in cattle. J. Exp. Med., 30: 299 - 311, 1919.
156. SÖDERLIND, O. - The isolation of Vibrio coli from pigs. Vet. Rec., 77: 193 - 196, 1965.
157. STEELE, T. W. & McDERMOTT, S. - Campylobacter enteritis in South Australia. Med. J. Aust., 2: 404 - 406, 1978.
158. STERN, N. J. - Campylobacter fetus ssp. jejuni: Recovery methodology and isolation from lamb carcasses. J. Food Sci., 46: 660 - 661, 1981a.
159. STERN, N. J. - Recovery rate of Campylobacter fetus ssp. jejuni on eviscerated pork, lam, and beef carcasses. J. Food Sci., 46: 1291 - 1293, 1981b.
160. STICHT-GROH, V. - Campylobacter in healthy slaughter pigs: A possible source of infection for man. Vet. Rec., 110: 104 - 106, 1982.
161. SVEDHEM, A. & KAIJSER, B. - Campylobacter fetus ssp. jejuni: A common cause of diarrhea in Sweden. J. Infect. Dis., 142: 353 - 359, 1980.
162. SVEDHEM, A.; KAIJSER, B. & SJOGREN, E. - The occurrence of Campylobacter jejuni in fresh food and survival under different conditions. J. Hyg. Camb., 87: 421 - 425, 1981.
163. TANNER, E. I. & BULLIN, C. H. - Campylobacter enteritis. Brit. Med. J., 2: 579, 1977.
164. TAYLOR, D. J. & OLUBUNMI, P. A. - A re-examination of the role

- of Campylobacter fetus sub-espèce coli in enteric disease of the pig. Vet. Rec., 109: 112 - 115, 1981.
165. TAYLOR, P. R.; WEINSTEIN, W. M. & BRYNER, J. H. - Campylobacter fetus infection in human subjects: Association with raw milk. Am. J. Med., 66: 779 - 783, 1979.
166. TELFER-BRUNTON, W. A. & HEGGIE, D. - Campylobacter - associated diarrhea in Edinburgh. Brit. Med. J., 2: 956, 1977.
167. TERPSTRA, J. I.; AKKERMANS, J. P. W. M. & OUWERKERK, H. - Investigations into the etiology of vibronic dysentery (Doyle) in pigs. Neth. J. Vet. Sci., 1: 5 - 13, 1968.
168. TIEHAN, W. & VOGT, R. L. - Waterborne Campylobacter gastroenteritis - Vermont. Morbid. Mortal. Wkly. Rep., 27: 207, 1978.
169. TOSH, F. E.; MULLEN, G. A. & WILCOX, D. E. - Outbreak of Campylobacter enteritis associated with raw milk - Kansas. Morbid. Mortal. Wkly. Rep., 30: 218 - 220, 1981.
170. TRUSCOTT, R. B. & MORIN, W. S. - A bacterial agent causing blue comb disease in turkeys. II. Transmission and studies of the etiological agent. Avian Dis., 8: 27 - 35, 1964.
171. ULLMANN, U. - Methods in Campylobacter. In: BERGAN, T. & NORRIS, J. R. - Methods in Microbiology. London Inc., Academic Press, 1979. Vol. 13, pp. 435 - 452.
172. 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. 23: 122 -

173. WALLACE, J. M. - Milk-associated Campylobacter infection.
Health Bull. (Edinb), 28: 57 - 61, 1980.
174. WANG, W. L.; BLASER, M. & CRAVENS, J. - Isolation of Campylobac
ter. Brit. Med. J., 2: 57, 1978.
175. WANG, W. L. L.; LUECHTEFELD, N. W.; BLASER, M. & RELLER, L.B. -
Comparison of CampyPak II with standard 5% oxigen and candle
jars for growth of Campylobacter jejuni from human feces. J.
Clin. Microbiol., 2: 291 - 294, 1982.
176. WANG, W. L. L.; LUECHTEFELD, N. W.; RELLER, L. B. & BLASER, M. -
Enriched Brucella medium for storage and transport of cultu-
res of Campylobacter fetus subsp. jejuni. J. Clin. Micro-
biol., 3: 479 - 480, 1980.
177. YANAGISAWA, S. - Large outbreak of Campylobacter enteritis among
schoolchildren. Lancet, 2: 153, 1980.
178. ZEMJAMINS, R. & HOYT, H. H. - The effect of growth factors on
the growth of Vibrio fetus. Am. J. Vet. Res., 21: 1109 -
1113, 1960.