

Revisão

Diferentes métodos de isolamento de *Campylobacter jejuni* em alimentos

Isolation of *Campylobacter Jejuni* in food. Different methods

Robson Maia Franco

Resumo

Esta revisão procura esclarecer a importância do *Campylobacter jejuni* como microrganismo emergente, incriminado em casos de infecção alimentar, quer seja em países em desenvolvimento ou desenvolvidos. Aborda ainda o perigo que as campilobacterioses podem oferecer às diferentes categorias de ingestores. Ressalta a necessidade da otimização de técnicas para detecção e isolamento de *C. jejuni* em produtos de origem animal e da realização de experimentos para a criação de métodos genuinamente nacionais.

Palavras chave: isolamento, *Campylobacter jejuni*

Introdução

A enterite por *Campylobacter* é uma zoonose na qual os animais são reservatórios da infecção. Em países industrializados (Reino Unido, Estados Unidos, Canadá), na Europa e em países em desenvolvimento (Argélia, Egito, Gâmbia, África do Sul, Bangladesh, China, Índia, Brasil, Chile, Peru e Costa Rica) os surtos de campilobacteriose na última década, envolvendo carne avícola, bovina e suína, água natural, leite não pasteurizado e queijos brandos, incriminam os alimentos contaminados como fonte de transmissão e caracterizam o organismo como um patógeno capaz de causar infecções alimentares (Bruce et al., 1977; Blaser et al., 1979a; Park et al., 1981; WHO, 1984; Shane e Montrose, 1985; Franco, 1988; Pinheiro et al., 1991).

As dificuldades de aplicação das técnicas de isolamento e a não notificação aos órgãos de saúde, fazem com que a doença seja pouco conhecida em países em desenvolvimento; porém, no Reino Unido, os laboratórios de isolamento desta bactéria, conforme reportado no *Communicable Disease Surveillance Center*, enumeraram em torno de 17.000 isolamentos em 1983 quando comparados aos de *Salmonella* em torno de 14.000, com maior incidência na área rural e nos meses de verão. A doença atinge principalmente crianças, recém nascidos, indivíduos imunodeprimidos, diabéticos e idosos, fazendo com

que o *Campylobacter* seja objeto de interesse por parte de organismos de saúde e grandes indústrias alimentícias (WHO, 1984).

Inúmeros procedimentos para detecção e isolamento foram estudados e vários trabalhos vêm surgindo na busca da otimização de técnicas para pesquisa do *C. jejuni* nos diferentes tipos de alimentos de origem animal ou não.

Metodologias

Métodos Clássicos

A partir de 1970, diferentes métodos para pesquisa e identificação de *C. jejuni* em alimentos e outros substratos vêm se aperfeiçoando através da utilização de atmosfera e temperatura de incubação ótimas para seu desenvolvimento e manutenção, e da aplicação de agentes seletivos para a inibição da microbiota autóctone e acompanhante, com ênfase nas diferentes enterobactérias (*Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Streptococcus faecalis*, *Lactobacillus*), ocorrendo, todavia, variações nas suas concentrações, dosagens e associações (King, 1957; Butzler et al., 1973; Skirrow, 1977; Tanner e Bullin, 1977; George et al., 1978; Smibert, 1978; Blaser et al., 1979b; Butzler e Skirrow, 1979; Karmali e Fleming, 1979; Lander e Gill, 1980; Wang et al., 1980; Gilchrist et al., 1981; Oosterom et al., 1981; Park et al., 1981; Patton et al., 1981; Smeltzer, 1981; Chan e Mackenzie, 1982; Christopher et al., 1982; Doyle e Roman, 1982; Gil e Harris, 1982; Mehlman e Romero 1982; Stern, 1982 a, b; Stern e Kotula, 1982; Park et al., 1987).

Bissulfito de sódio, cisteína e tioglicolato de sódio têm sido usados objetivando reduzir os radicais superóxidos e inibir o crescimento de organismos produtores de ácido láctico a partir da lactose, principalmente em amostras de leite, onde o ácido pode interferir na sobrevivência do *C. jejuni* (Doyle e Roman 1982; WHO, 1984).

Os meios seletivos não eliminam todos os outros microrganismos entéricos mas somente limitam o crescimento destes organismos favorecendo o isolamento de campilobacteres (Smibert, 1981).

Objetivando atender à necessidade microaerófila do microrganismo, determinados meios de cultivo são suplementados com compostos que aumentam a tolerância do *C. jejuni* ao oxigênio, extinguindo ânions superóxidos e peróxido de hidrogênio que ocorrem espontaneamente no meio de cultura, tendo o sulfato ferroso e o metabissulfato de sódio ação não enzimática da destruição de radicais superóxidos enquanto o piruvato de sódio age desviando o radical superóxido (George et al., 1978; Smibert, 1978; Giglchrist et al., 1981; Stern, 1981; Stern, 1982b).

Além de adição de sais, aos meios de cultivo, para aumentar a aerotolerância do *C. jejuni*, devem ser incubados em atmosfera microaerófila contendo 5% de O₂, 10% de CO₂ e 85% de N₂ proporcionando melhor crescimento (Smibert, 1981).

Mehlman e Romero (1982) recomendam a utilização do sulfato de sódio na concentração de 7,9 mmol, a qual é tolerada pelo *C. jejuni* e é capaz de inibir outros microrganismos.

Tanner e Bullin (1977) demonstraram que o pH=8.4, de meios básicos para cultura de *C. jejuni*, facilita a recuperação das poucas células de *Campylobacter* presentes nas amostras a serem analisadas, permitindo que este organismo prolifere na presença de grande número de *Escherichia coli* e *Streptococcus faecalis*.

Blaser et al. (1979b) indicaram a combinação de vancomicina, trimetoprim, polimixina B, anfotericina B, por atuarem inibindo, respectivamente, cocos Gram positivos, *Proteus*, *Enterobacteriaceae* e *Pseudomonas*, fungos e leveduras. Doyle e Roman (1982) sugeriram também, parte da combinação usada por Blaser et al. (1980), utilizando vancomicina, trimetoprim e polimixina B com diferença na concentração empregada e substituição da anfotericina B por cicloheximide "actidione" por apresentar o mesmo espectro antibiótico de ação.

A cefalozina e cefalotina são empregadas por serem ativas contra *Streptococcus faecalis*, *Enterobacter* sp, *Serratia* sp, *Pseudomonas aeruginosa*, alguns *Proteus* sp, *Yersinia enterocolitica*, *Bacterioides fragilis* e por permitirem a separação entre diferentes espécies de *Campylobacter* pois inibem o crescimento de *C. fetus fetus* e *C. fetus venereal* (Smibert, 1981).

Em função das complexas exigências culturais do *C. jejuni* (nutrição, atmosfera e temperatura de incubação), Smibert (1981), sugere que estas condições devam ser atendidas para o sucesso do seu isolamento, juntamente com o uso de antimicrobianos e que obtem-se melhores resultados com incubação em atmosfera microaerófila a 42 - 43°C.

Uma grande variedade de métodos bacteriológicos envolvendo meios e condições próprias, vem sendo desenvolvida para recuperar e isolar *C. jejuni* em alimentos; entretanto, ainda não se conhece qual o melhor método a ser usado em nossas condições.

Para obtenção de culturas puras que permitam a identificação de *C. jejuni*, as etapas do processamento bacteriológico podem ser constituídas de:

Técnica de enriquecimento seletivo

Tem como objetivo o favorecimento da multiplicação e do desenvolvimento de *Campylobacter* e a inibição da microbiota acompanhante (Bolton e Robertson 1982; Doyle e Roman 1982; Wesley et al., 1983; Park e Sanders, 1989,).

Neste procedimento, a primeira etapa é seletiva com incubação a 42°C em atmosfera microaerófila por período de 24 - 48 horas, com introdução de agentes seletivos e em alguns casos com incubação a 4°C.

Diversas são as formulações de meios líquidos de enriquecimento seletivo, entretanto os mais testados e comumente usados são os seguintes:

- Meio de enriquecimento, segundo Doyle e Roman (1982); o meio básico é o caldo Brucella adicionado de sangue lisado de cavalo, succinato de sódio, hidrocloreto de cisteína; a seletividade é fornecida pela adição de vancomicina, trimetoprim, polimixina B e cicloheximide.

- Meio de enriquecimento descrito por Mehlman e Romero (1982); é formulado a partir de uma base de proteose peptona nº 3, extrato de levedura, casaminoácidos, fostato de potássio, sulfato de amônia, agar, amido solúvel e sulfato de sódio que é o agente inibidor da microbiota acompanhante.

- Meio de enriquecimento conforme Stern e Kotula (1982); formulado a partir de caldo Brucella suplementado com mistura FBP (sulfato ferroso, metabissulfato de sódio, piruvato de sódio) que agem destruindo os radicais superóxidos e peróxido de hidrogênio no meio, aumentando a aerotolerância do *C. jejuni*.

- Meio *Campy thio enrichment broth* segundo Blaser et al. (1979b); meio formulado com caldo tioglicolato, agar, vancomicina, trimetoprim, polimixina B, anfotericina B, com incubação a 4°C por 8 horas (enriquecimento a frio), onde a baixa temperatura inibe o crescimento de *Campylobacter*. As bactérias acompanhantes são reduzidas pela ação dos antimicrobianos e o percentual de agar atua diminuindo a difusão do oxigênio.

- Meio de enriquecimento descrito por Tanner e Bullin (1977); formulado apenas com água peptonada alcalina com pH=8.4; a alcalinidade inibe o crescimento de *Enterobacteriaceae* facilitando o desenvolvimento do *Campylobacter*, com incubação a 42°C por 24 horas em microaerofilia.

Apesar da utilização de agentes antimicrobianos, atmosfera microaerófila e temperatura de incubação na fase de enriquecimento seletivo favoráveis ao crescimento e multiplicação de *C. jejuni*, faz-se necessário, após o período de incubação, a verificação das

características morfo-tintoriais do germe. Utilizando-se um enfregação, corado pelo método de Gram modificado por Hucker (ACUFF, 1992) e através da microscopia de imersão verifica-se a presença de bastonetes Gram negativos finos, espiralados ou sob a forma de S, vírgula ou asa de gaivota.

Meios para isolamento diferencial

Os meios sólidos de plaqueamento seletivo são formulados praticamente com os mesmos agentes descritos para os meios de enriquecimento seletivo, devendo ser suplementados com sangue desfibrinado de carneiro (5%). O plaqueamento direto de diluições adequadas da amostra, sem passagem anterior pela fase de enriquecimento é apropriado, sendo usado por inúmeros pesquisadores (Skirrow, 1977; Butzler e Skirrow, 1979; Bokkenheuser et al., 1979; Blaser et al., 1980; Stern et al., 1984) e podendo mostrar maior ou menor eficácia dependendo do alimento analisado e habilidade do microbiologista.

- agar Brucella FBP é um meio indicado por George et al. (1978); procura atender a exigência microaerófila do *C. jejuni* através da suplementação de sulfato ferroso, metabisulfito de sódio e piruvato de sódio.

- agar segundo Butzler citado por Patton et al. (1981); o meio formulado possui Columbia agar base, suplementado com sangue desfibrinado de carneiro, e os seguintes agentes inibidores da microbiota acompanhante: cefoperazone, rifampicina, colistin e anfotericina B.

- *Campy-Bap* (BLASER'S agar) proposto por Blaser et al. (1979a); é constituído de agar Brucella, sangue lisado de cavalo, vancomicina, polimixina B, lactato de trimetoprin, anfotericina B e cefalotina.

- *Campylobacter charcoal diferencial agar* (CCDA) - PRESTON BLOOD FREE MEDIUM, desenvolvido por Hutchinson e Bolton (1984); o meio básico é constituído de caldo nutriente nº 2 (OXOID), agar com adição de carvão bacteriológico, caseína hidrolisada, desoxicolato de sódio, sulfato ferroso, piruvato de sódio e cefoperazone de sódio; objetiva favorecer o isolamento de *C. jejuni*.

- *Campy-thio medium* tradicionalmente formulado com trypticase peptona, cloreto de sódio, fosfato dipotássico, tioglicolato de sódio, L-cistina, sulfito de sódio e agar que após esterilizado e resfriado a 50°C é incorporado com as soluções antibióticas descritas em *Campy-Bap*.

- SKIRROW'S agar, formulado por Skirrow (1977); constituído por agar sangue base (OXOID nº 2), sangue lisado de cavalo, vancomicina, polimixina B e lactato de trimetoprin.

- *Campylobacter* agar base (OXOID - CM 689); suplementado com sangue lisado e PRESTON *Campylobacter selective supplement* (SR 117) (polimixina B, rifampicina, lactato de trimetoprin, cicloheximide).

- *Campylobacter selective agar base "MERCK 2248"* (MERCK, 1990); incorporado de sangue desfibrinado de carneiro e suplementado com suplemento seletivo para *Campylobacter* "MERCK 2249" (Merck, 1990).

Tal como na fase de enriquecimento seletivo, no isolamento diferencial a incubação ocorre a 42°C por 24 horas em microaerofilia e a verificação das características morfo-tintoriais são indispensáveis para que após a confirmação de cultivo puro e isolado se proceda a ensaios bioquímicos (provas fisiológicas) para identificação do organismo.

Recuperação de células injuriadas

Devido o *C. jejuni* não crescer abaixo de 30°C e ser sensível às concentrações normais de oxigênio atmosférico, somente pequenos números de campilobacteres podem estar presentes em alimentos. Em consequência, o enriquecimento seletivo é necessário para detectar as poucas células cultiváveis de *C. jejuni* que podem estar presentes. Amostras de tamanhos maiores, caldo de enriquecimento seletivo, condições microaerófilas apropriadas e meio de isolamento seletivo ou técnicas de filtração são importantes para o isolamento de campilobacteres em alimentos. Vários sistemas de caldo de enriquecimento seletivo (Bolton e Robertson, 1982; Doyle e Roman, 1982; Park et al., 1983; Wesley et al., al., 1983; Rogol et al., 1985) agar para isolamento seletivo (Blaser et al., 1979a; Bolton et al., 1984), e métodos para produzir atmosfera microaerófila, (Kiggins e Plastridge, 1956) têm sido desenvolvidos e discutidos para isolamento de *C. jejuni*. Tem também sido reportados técnicas de enriquecimento-filtração com incubação a 37°C (Megraud, 1987), que aumentam o isolamento de *C. jejuni* e permite crescimento de outras espécies de *Campylobacter* de interesse em saúde humana.

O *C. jejuni* está presente nos alimentos em número reduzido, geralmente inferior a 100 células/grama, após haver sido submetidos a condições adversas, como aquecimento, refrigeração, congelamento, salga e/ou desidratação, regularmente empregados em processamento tecnológico dos produtos de origem animal. A competição com a microbiota própria (autóctone) e com microrganismos úteis, tecnologicamente desejáveis, introduzidos intencionalmente nos alimentos, como bactérias lácticas e leveduras, é também considerada como um fator capaz de limitar o crescimento do *C. jejuni* pela produção de bacteriocinas por aqueles microrganismos.

A recuperação fisiológica do microrganismo, exposto às condições descritas anteriormente, dever ser motivo de atenção do analista de alimentos, que deverá utilizar procedimentos específicos para facilitar a multiplicação da bactéria, atendendo às necessidades fisiológicas do microrganismo, utilizando técnicas para redução de O₂, aumento de tensão de CO₂, adição

de íons férricos, metabissulfito de sódio e piruvato de sódio como agentes recuperadores e aceleradores do crescimento de *C. jejuni*, ressaltando a importância do enriquecimento e plaqueamento seletivo na sequência das técnicas de isolamento de *C. jejuni* de alimentos de origem animal.

Métodos rápidos

Os métodos rápidos para detecção, enumeração, isolamento e caracterização de microrganismos em alimentos estão sendo desenvolvidos e muitos encontram-se em fase de estudo para atender interesses do controle de qualidade das indústrias alimentícias que não podem esperar pela demora das técnicas bacteriológicas tradicionais que levam em torno de sete dias para obtenção de um resultado conclusivo para *C. jejuni*. Estes novos métodos são freqüentemente mais sensíveis, específicos e seguros que as técnicas convencionais.

A técnica de enzima imunoensaio (EIA), também conhecida como *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA), tem se tornado a forma mais comum para detecção imunológica de microrganismos e seus metabólitos (toxinas). A EIA depende de três princípios: a perfeita especificidade da reação antígeno-anticorpo; a ampliação biológica da reação do anticorpo por uma enzima, e a habilidade do anticorpo em reter sua imunoreatividade após conjugação com uma enzima (Swaminathan e Prakash, 1989).

O imunoensaio de anticorpo-base monoclonal é eficaz para detectar patogênicos oriundos de alimentos, como: *Campylobacter*, *Listeria* e *Salmonella*, como também aflatoxinas e outras toxinas microbianas (Hartman et al., 1992); entretanto o formato imunoensaio por aglutinação em latex para *C. jejuni*, produzido comercialmente pela *Becton e Dickinson Microbiology Systems* não foi ainda aprovado pela AOAC (Hartman et al., 1992).

Os métodos rápidos permitem agilizar a recusa ou aceitação de uma partida ou intervir no decorrer do processamento, porém, são incapazes de fornecer cepas isoladas do microrganismo, indispensáveis para análises conclusivas de interesse epidemiológico.

Chudlow e Smith (1991) e Valery et al. (1991), relatam que os métodos rápidos e a automação em microbiologia e imunologia podem ser diretos: quando se baseiam no reconhecimento de constituintes específicos do organismo em questão, ou na sua enumeração, por participação de sondas genéticas, testes imunológicos e citofluorimetria de fluxo e indiretos: quando consistem em qualificar as modificações de parâmetros físicos ou químicos em meios de cultura, durante a fase de crescimento (impedancimetria).

A impedancimetria tem como objetivo verificar, por ocasião do crescimento dos microrganismos no meio que os contém, as modificações das características

deste. Estas modificações podem ser medidas através de dois eletrodos colocados em contato com o substrato. Os resultados são automaticamente interpretados de acordo com as alterações correspondentes ao nível de contaminação demonstrado em curvas de crescimento. As amostras são previamente semeadas em meios específicos de pré-enriquecimento e enriquecimento seletivo.

Apesar da importância e vantagens na aplicação de métodos rápidos no controle de qualidade microbiológico de alimentos, é importante salientar que são exigidos reagentes e equipamentos específicos que elevam em muito o custo das análises, inviabilizando a sua execução na maioria dos laboratórios brasileiros.

Objetivou-se mostrar nesta revisão que o *C. jejuni* faz parte do grupo de germes emergentes de importância em Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Pública, e esclarecer que a pesquisa pode ser procedida através de métodos clássicos, que estão sofrendo constantes alterações e inovações para obtenção de melhor eficácia. Observa-se ainda que os métodos aplicados não são padronizados e não apresentam uniformidade quanto aos diferentes tipos de alimentos comercializados, necessitando a realização de novos experimentos para a criação de métodos genuinamente nacionais.

Abstract:

Isolation of *Campylobacter jejuni* in food. Different methods.

The present review try to clarify the importance of *Campylobacter jejuni* as an emergent microorganism which is involved in food infection, found in underdeveloped ou developed countries. This study reports also the dangerousness of campilobacteriosis to diferent consumer's categories. The author points out the necessity of establishing techniques to detect and isolate *C. jejuni* in products of animal origin and to achieve new experiments in order to discover original national methods.

Key words: Isolation, *Campylobacter jejuni*

Referência Bibliográficas

- ACCUFF, G. R. Media, Reagentes and Stains. In: VANDERZANT (Ed.) Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. Compiled by the APHA Tecnical Committee on Microbiological Methods for Foods. 3 ed., Washington: APHA 1992. 1912p. Cap. 62, p. 1093 - 1208.
- BLASER, M. J., BERKOWITZ, I. D., LAFORCER, F. M., CRAVENS, J., RELLER, L. B., WANG, W. L. L. *Campylobacter enteritis: Clinical and epidemiology features. Ann. Intern. Med.*, v. 91, n. 5, p. 179-185, 1979a.

- BLASER, M. J., CRAVENS, J., POWERS, B. W., LA FORCE, F. M., WANG, W. L. *Campylobacter enteritis* associated with unpasteurized milk. *Am. J. Med.*, v. 67, p. 715-718, 1979b.
- BLASER, M. J., HARDESTY, H. L., POWER, B., WANG, W. L. L. Survival of *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* in biological milieus. *J. Clin. Microbiol.*, v. 11, n. 4, p. 309-313, 1980.
- BOKKENHEUSER, V. D., RICHARDSON, N. J., BRYNER, J. H., ROUX, D. H., SCHUTTE, A. B., KOORNHOF, H. J., FREIMAN, I., HARTMAN, E. Detection of enteric campylobacteriosis in children. *J. Clin. Microbiol.*, v. 9, p. 227-232, 1979.
- BOLTON, F. J., HUTCHINSON, D. N., COATES, D. Blood-free selective medium for isolation of *Campylobacter jejuni* from feces. *J. Clin. Microbiol.*, v. 19, p. 169, 1984.
- BOLTON, F. J., ROBERTSON, L. A selective medium for isolating *Campylobacter jejuni/coli*. *J. Clin. Pathol.*, v. 35, p. 462, 1982.
- BRUCE, D., ZOCHOWSKI, W., FERGUSON, I. R. *Campylobacter enteritis*. *Brit. Med. J.*, v.2, p. 1219, 1977.
- BUTZLER, J. P., DEKEYSER, P., DETRAIN, M., DEHAEN, F. Related Vibrio in stools. *J. Pediatr.* v. 82, n. 3, p. 493, 1973.
- BUTZLER, J. P., SKIRROW, M. B. *Campylobacter enteritis*. *Clin. Gastroenterol.*, v. 8, n. 3, p. 737-765, 1979.
- 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.*, v. 15, p. 12-15, 1982.
- CHIDLOW, J. M., SMITH, J. S. Microbiologic applications of fluorimmunoassay. In: Habermehl, K. O. (Ed) Rapid Methods and Automation in Microbiology and Immunology. Berlin : Springer-Verlag, 1991. 422p.
- CHRISTOPHER, F. M., SMITH, G. C., VANDERZANT, C. Effect of temperature and pH on the survival of *Campylobacter fetus*. *J. Food Protect.*, v. 45, n. 3, p. 253-259, 1982.
- DOYLE, M. P., ROMAN, D. J. Recovery of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from inoculated foods by selective enrichment. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 43, n. 6, p. 1343-1353, 1982.
- FRANCO, R. M. Isolamento de *Campylobacter jejuni* em carne de aves e miúdos. *Arq. Flum. Med. Veter.*, Niterói. v. 3, n. 3, p. 68-71, 1988.
- GEORGE, H. A., HOFFMAN, P. S., SMIBERT, R. M., KRIEG, W. R. Improved media for growth and aerotolerance of *Campylobacter fetus*. *J. Clin. Microbiol.*, v. 8, n. 1, p. 36-41, 1978.
- GILCHRIST, M. J. R., GREWEL, C. M., WASHINGTON II, I. A. Evaluation of media for isolation of *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* from fecal specimens. *J. Clin. Microbiol.*, v. 14, n. 4, p. 393-395, 1981.
- GILL, C. O., HARRIS, L. M. Survival and growth of *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* on meat and in cooked foods. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 44, n. 2, p. 259-263, 1982.
- HARTMAN, P. A., SWAMINATHAN, B., CURIALE, M. S., FIRSTENDERG-EDEN, R., SHARPE, A. N., COX, N. A., FUNG, D. Y. C., GOLDSCHMIDT, M. C. Rapid methods and automation. In: VANDERZANT (ed.) SPLITTSTOESSER (ed.) Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. Compiled by the APHA Technical Committee on Microbiological Methods for Foods. 3. ed., Washington: APHA 1992. 1912p. Cap. 39, p. 665-746.
- HUTCHINSON, D. N., BOLTON, F. J. An improved blood-free selective medium for isolation of *Campylobacter jejuni* from faecal specimens. *J. Clin. Pathol.*, v. 37, p. 956, 1984.
- KARMALI, M. A., FLEMING, P. C. *Campylobacter enteritis*. *Can. Med. Assoc. J.*, v. 120, p. 1525-1532, 1979.
- KIGGINS, E. M., PLASTRIDGE, W. N. Effect of gaseous environment on growth and catalase content of *Vibrio fetus* cultures of bovine origin. *J. Bacteriol.*, v. 72, p. 397, 1956.
- KING, E. O. Human infection with *Vibrio fetus* and a closely related *Vibrio*. *J. Infect. Dis.*, v. 101, p. 119-128, 1957.
- LANDER, K. P., GILL, K. P. W. Experimental infection of the bovine udder with *Campylobacter coli/jejuni*. *J. Hyg. Cambridge.*, v. 84, p. 421-427, 1980.
- MEGRAUD, F. Isolation of *Campylobacter* spp from pigeon feces by a combined enrichment-filtration technique. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 53, p.1394, 1987.
- MEHLMAN, I. J., ROMERO, A. Improved Growter Medium for *Campylobacter* Species. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 43, n. 3, p. 615-618, 1982.
- MERCK. Manual de Meios de Cultivo. Darmstadt: Merck., 1990. 355p.
- OOSTEROM, J., VEREIJKEN, M. J. G. M., ENGELS, G. B. *Campylobacter* isolations. *Vet. Quant.*, v. 3, p. 104, 1981.
- OXOID. The Oxoid Manual of Culture Media, Ingredients and other Laboratory Services. 5 ed. Basingstoke, 1982. 352p.
- PARK, C. E., SANDERS, G. W. A presuntive enrichment procedure for the isolation of *Campylobacter jejuni* from frozen foods. INTERNATIONAL WORKSHOP ON *Campylobacter* INFECTIONS. (5:1989: México) Anais... Puerto Vallarta, Mexico, 1989. Abstract. PARK, C. E., STANKIEWICZ, Z. K., LOVETT, J., HUNT, J. Incidence of *Campylobacter jejuni* in fresh

- eviscerated whole market chickens. *Can. J. Microbiol.*, v. 27, p. 841-842, 1981.
- PARK, C. E., STANKIEWICZ, Z. K., LOVETT, J., HUNT, J. FRANCIS, D. W. Effect of temperature, duration of incubation, and pH of enrichment culture on the recovery of *Campylobacter jejuni* from eviscerated market chickens. *Can. J. Microbiol.*, v. 29, p. 803, 1983.
- PARK, R. W. A., GRIFFITHS, P., CICCOGNANI, D. Some aspects of viability and growth of *Campylobacter jejuni*. *J. Appl. Bacteriol.*, v. 63, n. 14, 1987.
- PATTON, C. M., MITCHELL, S. W., POTTER, M. E., KAUFFMAN, A. F. Comparison of selective media for primary isolation of *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni*. *J. Clin. Microbiol.*, v. 13, p. 326-330, 1981.
- PINHEIRO, M. S., BARRUCAND, D. L., RICCIARDI, I. D., TIBANA, A. Avaliação do método de passivação do cobre para obtenção de microaerofilia e do agar cefoxitina no cultivo de *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli*. *Rev. Microbiol.*, v. 22, n. 4, p. 298-302, 1991.
- ROGOL, M., SHPAK, B., ROTHMAN, D., SECHTER, I. Enrichment medium for isolation of *Campylobacter jejuni* - *Campylobacter coli*. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 20, p. 125, 1985.
- SHANE, S. M., MONTROSE, M. S. The occurrence and significance of *Campylobacter jejuni* in man and animals. *Vet. Res. Commun.*, v. 9, p. 167-198, 1985.
- SKIRROW, M. B. *Campylobacter enteritis*: A "new" disease. *Brit. Med. J.*, v. 2, p. 09-11, 1977.
- SMELTZER, T. I. Isolation of *Campylobacter jejuni* from poultry carcasses. *Aust. Vet. J.*, v. 57, p. 511-512, 1981.
- SMIBERT, R. M. The genus *Campylobacter*. *Annu. Rev. Microbiol.*, v. 32, p. 673-709, 1978.
- SMIBERT, R. M. The genus *Campylobacter*. In: Star (Ed.) et al. *The Prokaryotes, a Handbook on Habitats, Isolation and Identification of bacteria*, New York: Springer-Verlag, 1981, p. 609-617.
- STERN, N. J. *Campylobacter fetus* subs. *jejuni*: recovery methodology on eviscerated pork, lamb and beef carcasses. *J. Food Sci.*, v. 46, p. 660-661, 1981.
- STERN, N. J. Selective and sensitivity of three media for the recovery of inoculated *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* from ground beef. *J. Food Safety*, v. 4, p. 169, 1982a.
- STERN, N. J. Methods for recovery of *Campylobacter jejuni* from foods. *J. Food Protect.*, v. 45, n. 14, p. 1332-1337, 1982b.
- STERN, N. J., GREEN, S. S., THAKER, N., KROUT, D. J., CHIU, J. Recovery of *Campylobacter jejuni* from fresh and frozen meat and poultry collected at slaughter. *J. Food Protect.*, v. 47, p. 372, 1984.
- STERN, N. J., KOTULA, A. W. Survival of *Campylobacter jejuni* inoculated into ground beef. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 44, n. 3, p. 1150-1153, 1982.
- STERN, N. J., ROTHENBERG, P. J., STONE, J. M. Enumeration and reduction of *Campylobacter jejuni* in poultry and red meats. *J. Food Protect.*, v. 48, p. 606, 1985.
- SWAMINATHAN, B. (Ed.), PRAKASH, G. (Ed.). *Nucleic Acid and Monoclonal Antibody Probes: Applications in Diagnostic Microbiology*. New York: Marcel Dekker, 1989.
- TANNER, E. I., BULLIN, C. H. *Campylobacter enteritis*. *Brit. Med. J.*, v. 2, p. 579, 1977.
- VALERY, S., DUMANIN, P. P., LAPLACE-BUILHE, C. et al. Les méthodes microbiologiques rapides en agroalimentaire. In: SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE MICROBIOLOGIE. *Les Microorganismes Contaminantes dans les Industries Agroalimentaires: colonization, detection et maîtrise*. Paris: Séction de Microbiologie Alimentaire. 1991.
- WANG, W. L. L., LUECHTEFELD, N. W., RELLER, L. B., BLASER, M. J. Enriched Brucella medium for storage and transport of cultures of *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni*. *J. Clin. Microbiol.*, v. 3, p. 479-480, 1980.
- WESLEY, R. D., SWAMINATHAN, B., STADELMAN, W. J. Isolation and enumeration of *Campylobacter jejuni* from poultry products by a selective enrichment method. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 46, p. 1097, 1983.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Report of the who consultation on veterinary public health aspects of prevention and control of *Campylobacter* infections. Moscow, 1984. p. 01-17.