

MINISTÉRIO DA SAÚDE

Manual Técnico de
Diagnóstico Laboratorial de
Campylobacter

Brasília – DF
2011

MINISTÉRIO DA SAÚDE
Secretaria de Vigilância em Saúde
Departamento de Apoio à Gestão de Vigilância em Saúde

Manual Técnico de
Diagnóstico Laboratorial de
Campylobacter

Gênero *Campylobacter*:
Diagnóstico Laboratorial Clássico
e Molecular

Série A. Normas e Manuais Técnicos

Brasília – DF
2011

© 2011 Ministério da Saúde.

Todos os direitos reservados. É permitida a reprodução parcial ou total desta obra, desde que citada a fonte e que não seja para venda ou qualquer fim comercial. A responsabilidade pelos direitos autorais de textos e imagens dessa obra é da área técnica. A coleção institucional do Ministério da Saúde pode ser acessada, na íntegra, na Biblioteca Virtual em Saúde do Ministério da Saúde: <http://www.saude.gov.br/bvs>

Série A. Normas e Manuais Técnicos

Tiragem: 1ª edição – 2011 – 1.000 exemplares

Elaboração, distribuição e informações:

MINISTÉRIO DA SAÚDE
Secretaria de Vigilância em Saúde
Departamento de Vigilância Epidemiológica
Coordenação-Geral de Laboratórios de Saúde Pública
Setor Comercial Sul, Quadra 4, Bloco A, Edifício Principal, 3º andar
CEP: 70304-000, Brasília – DF
E-mail: svs@saude.gov.br
Home page: www.saude.gov.br/svs

Coordenação

Lúcia Helena Berto – CGLAB/SVS/MS

Equipe de elaboração

Esta publicação foi elaborada por um grupo de profissionais pesquisadores, técnicos de bancada do Laboratório de Referência Nacional de Enteroinfecções Bacterianas do Instituto Oswaldo Cruz – IOC/Fundação Oswaldo Cruz – Fiocruz/RJ e do Instituto Adolfo Lutz – IAL/SP.

Equipe de revisão técnica:

Dália dos Prazeres Rodrigues
Miyoko Jakabi

Equipe de elaboração:

Grace Nazareth Diogo Theophilo¹
Miyoko Jakabi²
Harumi Sakuma²
Ruth E. G. Rowlands²
Jacqueline T. M. Peresi²
Yara Solange K. Fonseca²
Eliane Moura Falavina dos Reis¹
Norma dos Santos Lázaro¹
Renata Garcia Costa¹
Dália dos Prazeres Rodrigues¹

¹Laboratório de Referência Nacional de Enteroinfecções Bacterianas/IOC/Fiocruz

²Instituto Adolfo Lutz

Produção editorial:

Capa: NJOBS Comunicação (Eduardo Grisoni)
Projeto gráfico: NJOBS Comunicação (Eduardo Grisoni)
Diagramação: NJOBS Comunicação (Marília Assis)
Revisão: NJOBS Comunicação (Beth Nardelli e Clícia Silveira Rodrigues)
Normalização: NJOBS Comunicação (Beth Nardelli e Clícia Silveira Rodrigues) e Editora MS (Márcia Cristina Tomaz de Aquino)

Impresso no Brasil / Printed in Brazil

Ficha Catalográfica

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde.

Manual técnico de diagnóstico laboratorial de *Campylobacter*: gênero *Campylobacter*: diagnóstico laboratorial clássico e molecular / Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Laboratório de Referência Nacional de Enteroinfecções Bacterianas, Instituto Adolfo Lutz. – Brasília : Ministério da Saúde, 2011.

40 p. : il. – (Série A. Normas e Manuais Técnicos)

ISBN 978-85-334-1793-9

1. Análise bacteriológica. 2. Diagnóstico. 3. Intoxicação alimentar. I. Fundação Oswaldo Cruz. II. Laboratório de Referência Nacional de Enteroinfecções Bacterianas (Brasil). III. Instituto Adolfo Lutz. IV. Título. V. Série.

CDU 616-074:613.2.099

Catálogo na fonte – Coordenação-Geral de Documentação e Informação – Editora MS – OS 2011/0094

Títulos para indexação:

Em inglês: *Campylobacter* technical manual of laboratory diagnosis: *Campylobacter* Genre: classical and molecular diagnostics laboratory. Em espanhol: Manual Técnico para el diagnóstico de laboratorio de *Campylobacter*: Género *Campylobacter*: laboratorio de diagnóstico clásico y molecular.

Sumário

1	Introdução	5
2	Histórico	6
3	Características Gerais	9
4	Características Epidemiológicas	10
5	Patogenia e Fatores de Virulência	12
6	Principais Espécies Associadas às Infecções Humanas	15
7	Os Alimentos como Fonte de Infecção	17
8	Diagnóstico Laboratorial	19
9	Figuras	35
	Referências	37

1 Introdução

Embora várias espécies de *Campylobacter* sejam ubíquitas, algumas como *Campylobacter jejuni*, *C. coli* e *C. lari* são isoladas frequentemente a partir de casos de gastroenterite humana, sendo *C. jejuni* a principal espécie associada às Doenças de Transmissão Alimentar – DTA. Estudos reportam o isolamento do microrganismo no trato gastrointestinal de diversos animais, o que pode contribuir para a contaminação de alimentos de origem animal, representando um risco potencial para a saúde pública.

2 Histórico

O gênero *Campylobacter* foi inicialmente descrito em 1886 por Theodor Escherich que identificou uma bactéria com forma helicoidal, isolada de fezes diarreicas de neonatos assim como de felinos. Foram feitas diversas tentativas, sem sucesso, para o crescimento deste microrganismo em meios sólidos e somente em 1913 McFaydean e Stockman obtiveram a primeira cultura pura do que foi chamado “vibrio” e que atualmente é conhecido como *Campylobacter fetus*, isolada do útero de uma ovelha (KIST, 1985). Em 1919, Smith e Taylor propuseram o nome *Vibrio fetus* para os organismos isolados de abortos em bovinos (THEOBALD, et al.; 1920). Microrganismos muito semelhantes foram posteriormente descritos como *V. jejuni* e *V. coli*, isolados do jejuno de gado e suínos, respectivamente (JONES, 1931; DOYLE, 1944).

Um importante marco no estudo do gênero *Campylobacter* foi a pesquisa realizada por Elizabeth King que analisou sistematicamente amostras de *Vibrio fetus* isoladas de pacientes com septicemia e meningites, na qual pôde fazer uma discriminação entre o *V. fetus* e as espécies termotolerantes *V. jejuni* e *V. coli*, ainda que ela tenha conservado o nome provisório de *related vibrios* para os dois últimos (KING, 1957).

Estudos taxonômicos na década de 1960 culminaram na criação do gênero *Campylobacter* (1963), o qual era formado por vibrios microaeróbicos que não possuíam semelhança ao *Vibrio cholerae*. Dessa forma, *Vibrio fetus* foi denominado *Campylobacter fetus* assim como os “*related vibrios*” foram classificados como *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* (VÉRON; CHATERLAIN, 1973). Desde então, essa classificação tem sido revista especialmente em função da diversidade ecológica, da importância clínica e como resultado da aplicação de novos métodos taxonômicos.

Nas últimas décadas, o reconhecimento de certas espécies do gênero *Campylobacter* como patógenos humanos tem fortificado a importância deste gênero também na medicina veterinária. Algumas espécies como o *C. jejuni*, o *C. coli* e o *C. fetus* subsp. *fetus* têm sido consideradas importantes zoonoses, as quais resultaram em estudos dirigidos para a taxonomia, epidemiologia, biologia molecular e patogenia. Estudos recentes em modelos animais têm ajudado a elucidar mecanismos patogênicos desses organismos, especialmente quanto aos fatores de virulência.

A descoberta de novos campilos ou campilo-like-organisms – CLO relacionados à saúde dos hospedeiros e à aplicação de novas técnicas moleculares tem permitido a reclassificação das espécies.

Uma completa revisão da taxonomia, da nomenclatura do gênero *Campylobacter* e das bactérias relacionadas foi proposta por Vandamme e colaboradores (VANDAMME et al., 1991). A posição filogenética do gênero foi determinada pela hibridização DNA-rRNA e pelo cruzamento de dados genéticos e fenotípicos, o que forneceu a base da estrutura taxonômica utilizada na atualidade.

A família *Campylobacteraceae* inclui, de acordo Euzéby (2011), 32 espécies, 13 subespécies no gênero *Campylobacter*, nove no gênero *Arcobacter*, sete no gênero *Sulfurospirillum* e uma espécie no gênero *Dehalospirillum*:

- *Campylobacter avium*
- *Campylobacter butzleri*
- *Campylobacter canadensis*
- *Campylobacter cinaedi*
- *Campylobacter coli*
- *Campylobacter concisus*
- *Campylobacter cryaerophilus*
- *Campylobacter cuniculorum*
- *Campylobacter curvus*
- *Campylobacter fennelliae*
- *Campylobacter fetus* - *Campylobacter fetus* subsp. *fetus* e *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*
- *Campylobacter gracilis*
- *Campylobacter helveticus*
- *Campylobacter hominis*
- *Campylobacter hyoilei*
- *Campylobacter hyointestinalis* – *Campylobacter hyointestinalis* subsp. *hyointestinalis* e *Campylobacter hyointestinalis* subsp. *lawsonii*
- *Campylobacter insulaenigrae*
- *Campylobacter jejuni* – *Campylobacter jejuni* subsp. *doylei* e *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni*
- *Campylobacter lanienae*
- *Campylobacter lari* – *Campylobacter lari* subsp. *concheus* e *Campylobacter lari* subsp. *lari*

- *Campylobacter mucosalis*
- *Campylobacter mustelae*
- *Campylobacter nitrofigilis*
- *Campylobacter peloridis*
- *Campylobacter pylori* – *Campylobacter pylori* subsp. *mustelae* e *Campylobacter pylori* subsp. *pylori*
- *Campylobacter rectus*
- *Campylobacter showae*
- *Campylobacter sputorum* – *Campylobacter sputorum* subsp. *bubulus*, *Campylobacter sputorum* subsp. *mucosalis* e *Campylobacter sputorum* subsp. *sputorum*
- *Campylobacter subantarcticus*
- *Campylobacter upsaliensis*
- *Campylobacter ureolyticus*
- *Campylobacter volucris*

3 Características Gerais

Entre as principais características do gênero destaca-se a forma de bacilos curvos, espiralados, muito finos e compridos (0,2 nm a 0,5 nm de largura e 0,5 e 5nm de comprimento). São Gram-negativos e móveis por um único flagelo polar que apresenta de duas a três vezes o comprimento da célula. O flagelo é responsável pelo seu movimento característico em forma de saca-rolha ou vaivém. Em culturas jovens é possível a observação da morfologia semelhante à asa de gaivota. Não formam esporos, mas em culturas envelhecidas adquirem uma morfologia cocoide correspondente a formas não cultiváveis. São quimiorganotróficos e não fermentam nem oxidam açúcares, obtendo energia a partir de aminoácidos ou de componentes intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico.

A grande maioria das espécies é positiva para a enzima citocromo-oxidase e redutoras de nitrato. As espécies *C. coli* e *C. lari* são muito semelhantes, sendo diferenciadas por testes bioquímicos: enquanto a espécie *C. lari* não é capaz de hidrolisar o indoxilacetato, mas cresce em presença de 30 µg de ácido nalidíxico, a espécie *C. coli* apresenta resultado inverso para estas reações. *Campylobacter jejuni* subespécie *doylei* diferencia-se do *C. jejuni* subespécie *jejuni* por não ser capaz de reduzir nitrato a nitrito e crescer a 42°C.

A característica mais marcante do gênero *Campylobacter* é a microaerofilia, requerendo baixa tensão de oxigênio para sua multiplicação. O crescimento é inibido quando a concentração de O₂ é menor que 3% e maior que 15%, sendo a concentração ideal de 5%. Além disso, são também capnofílicos, ou seja, requerem cerca de 10% de CO₂ para sua multiplicação (DOYLE; JONES, 1992).

As espécies *C. jejuni*, *C. coli* e *C. lari* são denominadas de campilobacteres termofílicos, visto que crescem em uma faixa bastante estreita de temperatura, que varia entre 30°C e 47°C, com um ótimo de 42°C (PARK, 2002).

Esses microrganismos são altamente sensíveis ao sal, sendo esta sensibilidade variável em função da temperatura. Assim, não se multiplicam em meios contendo 2% de NaCl quando mantidos a 30°C ou a 35°C. À temperatura de 4°C são sensíveis em meios contendo 1% de NaCl. São também bastante sensíveis ao pH ácido, crescendo na faixa de pH entre 5,5 - 8,0, com valor ótimo próximo do neutro (6,5-7,5) e à desidratação.

4 Características Epidemiológicas

A campilobacteriose é uma zoonose de distribuição mundial. As espécies de *Campylobacter* são organismos associados a animais de sangue quente, sendo comensais do trato gastrointestinal de bovinos, suínos, ovinos, felinos, cães, roedores silvestres e domésticos, aves domésticas e pássaros. Foi demonstrado que um grande percentual dos animais de corte possui esse microrganismo nas fezes. As aves constituem o principal reservatório de *C. jejuni*, sendo possível encontrá-lo em fezes e carcaças de aves recém-abatidas. As aves são portadoras naturais de *Campylobacter*, no entanto, não apresentam sinais clínicos da enfermidade. O suíno é o principal portador de *C. coli*, podendo ter *C. jejuni* como comensal habitual. Muitos casos de enterite humana estão associados ao consumo de água e/ou alimentos de origem animal, contaminados ou resultantes do contato com animais.

Em países desenvolvidos, a diarreia por *Campylobacter* é mais frequente nos meses quentes, em que são afetados todos os grupos étnicos de ambos os sexos, sendo a carne de ave mal cozida o principal veículo. Por outro lado, a maioria dos casos da enfermidade em países em desenvolvimento parece estar associada à faixa etária correspondente às crianças pequenas. As espécies *C. jejuni* e *C. coli* são agentes causais importantes de diarreias agudas de viajantes que visitam regiões em desenvolvimento.

Clinicamente, o gênero *Campylobacter* tem sido reconhecido como agente de enterocolite humana transmitida por alimentos em diversas partes do mundo. Duas espécies deste gênero, *C. jejuni* e *C. coli*, são isoladas na maioria dos casos de infecções por *Campylobacter* com proporções diversas em cada país. Nos Estados Unidos, acredita-se que seja mais frequente que *Salmonella* e *Shigella* juntas. Muitas investigações clínicas e epidemiológicas têm estabelecido que *C. jejuni* é uma das causas mais comuns de enterite bacteriana esporádica nesse país, alcançando cerca de 2,4 milhões de casos anualmente, segundo o Centers for Disease Control and Prevention – CDC. Os casos estimados de campilobacteriose na Inglaterra e nos Estados Unidos são semelhantes à frequência estimada de salmonelose humana nesses países.

No Brasil, tem-se demonstrado que *C. jejuni* é também um importante agente da gastroenterite aguda e crônica, afetando principalmente crianças. Nos países em desenvolvimento, a enterocolite é endêmica e a frequência de casos assintomáticos é elevada. Os quadros sintomáticos são mais comuns na infância e no início da adolescência, decrescendo com a idade.

As infecções por *Campylobacter* são usualmente esporádicas, ocorrendo nos meses de verão e no início do outono, causadas pela ingestão de alimentos cozidos e manipulados inapropriadamente, com maior incidência relacionada ao consumo de frangos. A incidência de infecção segue uma distribuição bimodal, com elevado índice em bebês e crianças jovens, seguida de um segundo pico de adultos entre 20 e 40 anos. Os surtos normalmente acontecem nos meses de primavera e outono e nos últimos anos estes têm sido associados à ingestão de água e alimentos contaminados.

5 Patogenia e Fatores de Virulência

Campilobacterioses são infecções agudas causadas por algumas espécies do gênero *Campylobacter* que acometem homens e animais, podendo resultar em doenças diarreicas de severidade variável. A transmissão das infecções dos animais ao homem tem sido conhecida para as espécies *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* e *C. upsaliensis*. A espécie *C. fetus* subespécie *venerealis* causa aborto enzoótico em gado bovino, enquanto o *C. fetus* subespécie *fetus* causa a mesma doença em ovinos, ocasionalmente em suínos e, esporadicamente, em bovinos.

O microrganismo é adquirido pela ingestão de alimentos contaminados ou por contato com fezes de animais infectados. A espécie *C. jejuni* é sensível ao pH gástrico, devendo ser ingerido um inóculo de 10^4 para que haja infecção, entretanto, em alguns casos, doses da ordem de 500 microrganismos são capazes de causar infecção (ROBINSON, 1981; BLACK et al., 1988).

A espécie *C. upsaliensis* raramente é isolada de diarreia, entretanto, causa bacteremia em pacientes imunocomprometidos. É mais resistente ao poder bactericida do soro que as outras espécies termotolerantes. A fonte de infecção ainda não está bem estabelecida, embora animais, em especial os cães, e alimentos como leite não pasteurizado e seus derivados tenham sido descritos como veículos dessa bactéria. À semelhança de outros patógenos entéricos, a transmissão fecal-oral e de pessoa a pessoa são importantes vias de transmissão.

Embora os microrganismos não se multipliquem à temperatura ambiente, uma pequena dose infecciosa (500 células) pode facilmente causar contaminação cruzada entre carnes sem cozimento e processadas, sendo esta uma provável causa para o fato da campilobacteriose ser mais frequente que a salmonelose em muitos países.

Os sintomas de infecção por *Campylobacter* incluem dor abdominal aguda, diarreia (que pode ser aquosa ou conter sangue), náusea, dor de cabeça, dor muscular e febre. A diarreia se inicia geralmente após 24 horas do início dos sintomas. A infecção por *Campylobacter* depende dos fatores do hospedeiro e do patógeno, sendo considerada uma doença autolimitante com duração de um a sete dias, afetando os intestinos grosso e delgado. O microrganismo é excretado nas fezes durante várias semanas após terem cessado os sintomas.

A enfermidade varia desde uma forma branda de curta duração a um quadro mais severo e prolongado com características semelhantes à shigelose ou salmonelose. Algumas vezes a infecção pode mimetizar um quadro de apendicite aguda e resultar em cirurgia desnecessária. Mortes causadas pela infecção com *C. jejuni* são raras, mas quando ocorrem atingem principalmente crianças, idosos ou pacientes portadores de doenças de base (TAUXE, 1992).

Em neonatos, a diarreia pode apresentar-se sanguinolenta e sem nenhum outro sintoma. Os neonatos também podem desenvolver febre severa e persistente, necessitando diferenciar de febre tifoide.

Pacientes imunocomprometidos podem evoluir para o quadro de colicistite aguda, pancreatite, cistite, artrite reativa e outras complicações como síndrome hemolítico-urêmica – SHU, nefrite intersticial, hepatite e síndrome de Guillain-Barré – GBS. Atualmente, *Campylobacter* é conhecido como o principal microrganismo associado à GBS, que é um distúrbio autoimune do sistema nervoso periférico (fraqueza muscular normalmente simétrica e ascendente) e que pode ser confundido com botulismo.

Infecções extraintestinais podem ocorrer em pacientes com o Vírus da Imunodeficiência Humana – HIV positivos e imunocomprometidos, podendo causar bacteremia, bursite, artrite, infecções no trato urinário, endocardite, peritonite, aborto e septicemia neonatal.

O tratamento com antibióticos é recomendado somente para as formas mais severas, sendo dispensado nos casos brandos. As espécies *C. jejuni* e *C. coli* são sensíveis a uma variedade de agentes antimicrobianos, inclusive macrolídeos, fluoroquinolonas, aminoglicosídeos, cloranfenicol e tetraciclina. A eritromicina tem sido a droga de escolha para o tratamento de *C. jejuni* nas infecções do trato gastrointestinal e a ciprofloxacina é uma boa droga alternativa. A terapia inicial das infecções por *Campylobacter* com eritromicina ou ciprofloxacina é efetiva na eliminação do organismo pelas fezes e pode também reduzir a duração dos sintomas associados à infecção (BLASER, 1995).

C. jejuni geralmente é susceptível a eritromicina com taxas de resistência menores que 5%. Contudo, em *C. coli* esse percentual é variável e alguns estudos relatam resistência de mais de 80% de algumas cepas. Embora a ciprofloxacina seja efetiva no tratamento de infecções por *Campylobacter*, a resistência a fluoroquinolonas durante o tratamento tem sido documentada. Alguns estudos *in vitro* sugerem que o aumento da resistência a essa classe de antimicrobianos está associado ao uso de antibióticos em aves, o que acarretaria diminuição da efetividade dessas drogas no futuro (VELASQUEZ et al., 1995).

Estudos epidemiológicos realizados tanto em países desenvolvidos quanto em desenvolvimento sugerem a existência de cepas com diferentes graus de patogenicidade e distintas respostas dos afetados pela bactéria.

Sintomatologias clínicas variadas indicam a existência de diferentes mecanismos de virulência entre as cepas de distintas regiões geográficas. O *C. jejuni* é considerado mais virulento devido a sua resistência à fagocitose, seguido de *C. coli*.

Muitas cepas podem invadir as células epiteliais, causando inflamações na própria lâmina e abscessos nas criptas semelhantes aos produzidos por *Shigella*, aparecendo hemácias e leucócitos nas fezes (diarreia inflamatória e disenteria). Podem atravessar a mucosa intestinal e proliferar na lâmina própria e nos gânglios, semelhante à infecção por *Salmonella* (infecções extraintestinais), embora a ação do soro iniba a bacteremia na maioria dos casos.

As espécies *C. jejuni*, *C. coli* e *C. lari* produzem fator citotônico que é semelhante às enterotoxinas CT de *Vibrio cholerae* e LT de *Escherichia coli*, enteropatogênica – ETEC, capazes de estimular a adenilciclase e provocar acúmulo de adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (cAMP ou AMP, responsável por alterações nos processos secretórios e absorptivos da mucosa intestinal (RUIZ-PALACIOS et al., 1983) Esta toxina tem massa molecular entre 60 KDa e 70 KDa, sendo completamente inativada em pH 2 e 8; produz resposta citotônica nas células de tumor adrenal de camundongos (Y-1), nas células de ovário de hamster chinês – CHO e Vero com produção de secreção fluida em ligadura de alça intestinal de coelhos e ratos, aumentando a permeabilidade no teste dérmico em coelhos. O nível de produção dessas enterotoxinas nas cepas de campylobacteres está entre 20 e 200 vezes menor do que para LT ou CT (JOHNSON; LIOR, 1986) e é parcialmente neutralizado pelo anticorpo para CT ou LT. Além dessa toxina, essas espécies produzem citotoxina, sensível a tripsina e tóxica para células de rim bovino, Vero e HeLa. A citotoxina é lábil a 70°C, por 30 minutos; estável a 60°C, por 30 minutos e não é neutralizada pelo antissoro para Shiga Toxin (*Shigella dysenteriae*), *Clostridium difficile* Toxin ou verotoxin (*E. coli*). Tanto a enterotoxina quanto a citotoxina são produzidas por espécies termofílicas.

Além das enterotoxinas e das citotoxinas, outra substância termolábil sensível a tripsina e não dializável, a Cytolethal Distending Toxin – CLDT está presente em filtrados de culturas de muitas cepas de *C. jejuni*, *C. coli* e *C. lari*. A CLDT é citoletal para células CHO, Vero, HeLa e Hep2, mas negativas para Y-1, assim como para o acúmulo de fluidos em ligadura de alça intestinal de coelhos adultos, camundongos latentes e no teste intradérmico de coelhos. A CLDT tem sido a toxina mais estudada por causar aumento e distensão de células, sendo inativadas por aquecimento a 70°C durante 15 minutos e por tripsina.

Foi demonstrada a existência de plasmídeos em células de *C. jejuni*, embora o seu papel e sua função na doença ainda não estejam esclarecidos. Estudos experimentais, em camundongos e pintos, indicaram que *C. jejuni* localiza-se nas criptas contendo muco, onde se realiza a colonização, sem aderência às células epiteliais das microvilosidades (LEE, 1986). A grande motilidade e a forma espiralada facilitam a colonização do muco. O *C. jejuni* é atraído quimiotaxicamente pela mucina, podendo utilizá-la como substrato para crescimento. Experimentalmente, a colonização das criptas cecais pelo *C. jejuni* é diminuída ou impedida pela colonização de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Citrobacter diversus* que ocupam os mesmos nichos ecológicos, produzindo metabólitos antagonistas do *C. jejuni*.

6 Principais Espécies Associadas às Infecções Humanas

Campylobacter fetus

Campylobacter fetus subespécie *fetus* está primariamente associada à bacteremia e às infecções extraintestinais em pacientes com doenças de base, mas estando também relacionada com processos de aborto séptico, artrite séptica, abscessos, meningites, endocardites, aneurismas, tromboflebitas e peritonites. Embora a gastroenterite possa ocorrer com essa variante, a incidência é, provavelmente, subestimada porque esta espécie não cresce bem a 42°C e apresenta sensibilidade a cefalotina, antimicrobiano usado em alguns meios seletivos comuns para a cultura de fezes.

Campylobacter fetus subespécie *venerealis* raramente tem sido isolada de infecções humanas, sendo o agente causador de campilobacteriose venérea em bovinos, determinando infertilidade. A diferença entre as subespécies é a capacidade de crescimento da subespécie *fetus* em meio de glicina a 1%.

Campylobacter hyointestinalis

Anteriormente, esta espécie somente era isolada de animais, sendo o agente causador de doenças como ileíte em porcos. Atualmente, tem sido recuperada de *swabs* retais de homossexuais masculinos com sintomas de proctite. *Campylobacter hyointestinalis* apresenta reações bioquímicas similares à espécie *C. fetus* subespécie *fetus*, diferenciando-se pelo seu crescimento a 42°C e produção de H₂S em meio TSI – Triple Sugar Iron.

Campylobacter consisus* e *Campylobacter rectus

A espécie *Campylobacter consisus* tem sido relacionada principalmente às doenças periodontais, contudo também tem sido isolada de pacientes com bacteremia. Seu papel em doenças diarreicas ainda não está bem estabelecido e alguns estudos sugerem que o microrganismo não é patogênico ao homem (ENGBERG et al., 2000; GOOSENS et al. 1990; STEELE; OWEN, 1988; VAN ETTERIJCK, 1996). A espécie *C. rectus* tem sido primariamente isolada de pacientes com infecções periodontais ativas, mas também de infecções pulmonares (RAMS; FEIK; SLOTS, 1993).

Campylobacter upsaliensis

Esta é uma espécie termotolerante que raramente é isolada de diarreias, mas produz bacteremia em pacientes imunocomprometidos. São mais resistentes ao poder bactericida do soro que as outras espécies termófilas, razão pela qual podem sobreviver no sangue. A sua fonte de infecção ainda não se encontra bem estabelecida, mas parece estar relacionada ao convívio com animais, especialmente cães, e consumo de leite não pasteurizado e seus derivados.

Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli

Campylobacter jejuni subespécie *jejuni* é o agente causal de diarreias, sendo considerado o mais virulento devido a sua maior resistência a fagocitose, e a subespécie *doylei* diferencia-se da subespécie *jejuni* pela sua incapacidade de reduzir nitrato a nitrito e não crescer à temperatura de 42°C, sendo raramente recuperada de pacientes com infecções gastrointestinais.

Campylobacter coli produz uma diarreia mais branda do que o *C. jejuni*. Ambos encontram-se como comensais do trato intestinal de um amplo grupo de animais, principalmente todas as variedades de aves de criação devido a sua adaptação à temperatura de 42°C a 43°C.

O espectro da doença provocada por estas espécies pode variar desde casos assintomáticos àqueles mais severos. As infecções sintomáticas normalmente são autolimitantes, porém as recaídas podem ocorrer em 5% a 10% dos pacientes não tratados.

Infecções extraintestinais têm sido descritas seguidas de enterites e incluem bacteremia, hepatite, colecistite, pancreatite, aborto, sepse neonatal, síndrome hemolítica urêmica, nefrite, prostatite, infecções do trato urinário, peritonite, miocardite, artrite séptica e formação de abscessos (SKIRROW; BLASER, 2000). A bacteremia tem sido relatada em uma proporção de 1,5/1000 casos de infecções, sendo que a maior incidência ocorre em pessoas idosas (SKIRROW et al., 1993). A doença diarreica persistente e a bacteremia podem ocorrer em hospedeiros imunocomprometidos, bem como em pacientes portadores do HIV.

Campylobacter lari

Esta espécie tem sido isolada do intestino de gaivotas, assim como de outros animais e do homem, porém a patogenicidade humana ainda não foi totalmente elucidada. Esta espécie diferencia-se das demais pela reação negativa na prova de hidrólise do substrato indoxil-acetato e pela sua resistência natural ao ácido nalidíxico.

7 Os Alimentos como Fonte de Infecção

Os estudos voltados para analisar a presença de *Campylobacter* spp. em alimentos foram iniciados em 1972 e na atualidade esta avaliação visa à identificação e ao controle das principais fontes: carnes, aves, leite e água. Isso se deve ao fato de que estes microrganismos compõem a microbiota intestinal de bovinos, ovinos, suínos, cães, gatos, aves domésticas e silvestres.

Entre esses, as aves são os principais reservatórios de *C. jejuni*. Esses microrganismos podem ser encontrados nas fezes e nas carcaças de aves abatidas, contudo nos ovos a contaminação é pouco provável. Apesar de reconhecidos em aves, estas são tidas como portadoras assintomáticas por não apresentarem, em nenhuma oportunidade, sinais clínicos. Outro reservatório reconhecido é representado pelos suínos, os quais são os principais veiculadores de *C. coli* e *C. jejuni*.

Os bovinos geralmente contêm *C. jejuni* em suas fezes, ocorrendo contaminação das carcaças durante os procedimentos de abate e evisceração, porém, sua frequência é inferior àquela detectada em aves e suínos. De modo semelhante, o leite pode ser contaminado a partir de fezes e causar gastroenterite quando consumido sem pasteurização.

Práticas tecnológicas inadequadas na cadeia produtiva de alimentos de origem animal contribuem para a propagação do microrganismo nos alimentos e nos derivados de animais. Na produção de carne, o nível de contaminação por *C. jejuni* e *C. coli* cai consideravelmente a partir do armazenamento sob refrigeração. Isso é compreensível, considerando que a temperatura ótima para o crescimento de *Campylobacter* spp. é elevada (42°C a 43°C), com exigência de uma temperatura mínima de 30°C.

De um modo geral, os animais e as aves utilizados como alimentos estão sujeitos a contaminações por uma grande variedade de microrganismos patogênicos, incluindo o gênero *Campylobacter*. Por essa razão, o controle dos alimentos deve ser realizado em todas as fases da cadeia de produção, distribuição e armazenamento, bem como informações adicionais para o preparo adequado e o consumo final pelo consumidor.

Medidas higiênico-sanitárias aplicadas no local de produção podem reduzir o patógeno, por exemplo, o fornecimento de água clorada para as aves, o que tem se mostrado efetivo na

redução da carga microbiana. O transporte das aves para o abatedouro representa uma etapa que envolve risco de infecção entre os animais. Estes riscos individuais ou associados podem ser diminuídos pela estrita atenção à higiene e à sanitização de veículos e gaiolas, bem como a redução do *stress* dos animais durante o transporte.

A contaminação pode ocorrer no abate devido a processos inadequados durante a evisceração, a depenagem e o resfriamento. A separação de operações (áreas sujas e limpas) e boas práticas de processamento contribuem para a minimização das contaminações. Além disso, tratamentos químicos e físicos têm sido empregados no processamento tecnológico de alimentos. A sanitização de carnes de aves pode ser realizada utilizando-se cloro, ácido acético e ácido láctico. A radiação ionizante com aplicação de dose de 3.0 kGy tem sido proposta para o controle desse patógeno nas carcaças de frango.

Embora a aplicação de boas práticas de produção e processamento minimize a contaminação de carcaças de frangos, a educação e a conscientização dos consumidores na manipulação correta destes produtos são de fundamental importância no controle e na prevenção de doenças causadas por esse patógeno. Falhas durante transporte, armazenamento e manipulação (cocção inadequada e contaminação cruzada) podem favorecer a multiplicação do patógeno e, conseqüentemente, a ocorrência de surtos.

8 Diagnóstico Laboratorial

Requisitos essenciais para o cultivo e a identificação

Composição dos meios seletivos

O desenvolvimento do meio de Skirrow foi a chave para o sucesso no estudo de campilobacteres termotolerantes. Este meio contém peptonas como fonte de nutrientes, sangue lavado de cavalo e antibióticos para prevenir o crescimento de outros microrganismos. Estes ingredientes formam a base para a maioria dos meios de uso comum no isolamento de *Campylobacter* (POST, 1995)

Todo meio utilizado para o isolamento de *Campylobacter* deve conter peptonas e antibióticos; a maioria contém sangue e muitos incluem agentes que capturam o oxigênio (superóxido e peróxido de hidrogênio) para superar seus efeitos tóxicos nestas espécies.

Fonte de nutrientes

Tendo em vista que a espécie *Campylobacter* não fermenta carboidratos, as peptonas são incluídas no meio como fonte de nutrientes. O caldo Preston (BOLTON; ROBERTSON, 1982) e o Exeter (MARTIN et al., 1996) contém extratos de carne e peptona. Os caldos Bolton e *Campylobacter* Enrichment Broth – CEB têm uma formulação que consiste de peptonas, extrato de levedura e ácido alfa-cetoglutárico, um intermediário do ciclo do ácido tricarbóxico.

Sangue

Muitos meios utilizados para o isolamento de *Campylobacter* contém sangue (5% a 7% - v/v) para capturar os componentes tóxicos do oxigênio que podem ser formados quando o meio é exposto à luz. O sangue de cavalo tem-se mostrado mais eficaz.

Antibióticos

A inclusão de antibióticos no meio de isolamento é crucial para a recuperação de *Campylobacter*. Esta espécie é resistente a alguns antibióticos incluindo a vancomicina (inibe os cocos Gram-positivos), polimixina B (inibe a família *Enterobacteriaceae* e

Pseudomonas spp.), trimetoprim (inibe *Proteus* e cocos Gram-positivos) e cefalosporinas (inibem *Enterobacter* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Serratia* spp., *Pseudomonas aeruginosa* e algumas espécies de *Proteus*). A rifampicina foi substituída por vancomicina no meio Preston, visto que alguns estudos têm demonstrado que a rifampicina pode ser inibidora de células estressadas de *C. jejuni* (HUMPHREY; CRUICKSHANK, 1985; HUMPHREY, 1990).

Antibióticos que inibem mofo e leveduras são usualmente incluídos nos meios para *Campylobacter*. Até recentemente, a cicloheximida foi o antifúngico mais amplamente utilizado, mas agora é considerado tóxico para inclusão em meios microbiológicos. Como substitutos existem a anfotericina B, demonstrada como um substituto satisfatório para a cicloheximida (MARTIN et al., 2002) ou a natamicina.

Um número de antibióticos comumente usados nos meios para isolamento de *Campylobacter* podem adversamente afetar a recuperação de algumas espécies ou cepas. Nachamkin, Engberg e Aarestrup (2000) descreveram que a cefalotina, a colistina e a polimixina B podem inibir algumas cepas de *C. jejuni* e *C. coli* e também *C. fetus* subespécie *fetus*, *C. jejuni* subespécie *doylei* e *C. upsaliensis*.

Atmosfera de incubação

Existem vários métodos para obter uma atmosfera adequada ao crescimento do *Campylobacter*, contudo, devido à praticidade do uso tem-se adotado com maior frequência a utilização de envelopes geradores de gases, comercialmente disponíveis (BBL, Oxoid, Bio-Merieux).

- Substituição de uma atmosfera normal por uma mistura apropriada de gases: retira-se o ar contido na jarra de anaerobiose com bomba de vácuo e efetua-se a substituição por uma mistura contendo 85% de nitrogênio, 10% de dióxido de carbono e 5% de oxigênio.
- Utilização de geradores de gases comerciais especiais para *Campylobacter*: BBL, Oxoid, Bio-Merieux e Probac, cuja atmosfera aproximada é de 5% a 10% de oxigênio e de 5% a 12% de dióxido de carbono.
- Geradores de hidrogênio e oxigênio para anaerobiose: o qual é utilizado sem o catalizador de paládio.
- Geradores opcionais: para jarra de 2,5l de capacidade:
 - › metade de um “bombril” embebido em solução de sulfato de cobre saturado (previamente preparada) ou
 - › metade de um Alka-Seltzer (em uma placa) acrescida de solução de sulfato de cobre ou
 - › um comprimido de Sonrisal macerado (em uma placa) o qual será introduzido na jarra acrescida de solução de sulfato de cobre.

Solução de sulfato de cobre

Sulfato de cobre anidro	25g
Água destilada	500mL
H ₂ SO ₄	1,6g
Tween 80	1,0mL

A metodologia inclui incubação das placas em atmosfera de microaerofilia (5% a 6% de oxigênio; 10% de dióxido de carbono; 84% a 85% de nitrogênio) requerida pelo *Campylobacter* e em elevadas temperaturas de 42°C a 43°C para seleção das espécies termotolerantes.

Amostras clínicas

O diagnóstico para a detecção do microrganismo pode ser realizado pelo exame direto ou cultivo. O uso de métodos sorológicos para o diagnóstico em alguns casos somente tem valor para pesquisa, já que nos países em desenvolvimento podem ser detectados elevados títulos na população. O exame direto consiste na utilização de microscópio de campo escuro ou contraste de fase das amostras fecais, coletadas até duas horas após sua evacuação, permitindo um diagnóstico presuntivo rápido quando é observada a motilidade do tipo saca-rolha ou vaivém, em sua maioria acompanhada por eritrócitos e neutrófilos.

Para cultivo e isolamento a partir de material fecal é requerida uma atmosfera de microaerofilia, meios de cultivo seletivos para inibir a flora acompanhante, temperatura ótima de desenvolvimento (42°C a 43°C), ainda que possam desenvolver a 37°C, pH ótimo de crescimento (6,5 a 6,9).

Coleta e transporte de material

A coleta da amostra pode ser realizada utilizando *swab* retal ou por evacuação espontânea, devendo ser processada o mais rápido possível, visto que o gênero *Campylobacter* é extremamente sensível ao oxigênio. Em pacientes hospitalizados o exame realizado em uma única amostra usualmente fornece resultados positivos, entretanto caso ocorra intervalo entre a coleta e a análise laboratorial superior a duas horas é necessária a utilização de meios de transporte. O meio de transporte também é sugerido quando a amostra é coletada por meio de *swabs* retais ou quando as fezes *in natura* não podem ser processadas imediatamente após a coleta.

Muitos meios de transporte têm sido descritos para *Campylobacter*, incluindo água peptonada alcalina com tioglicolato e cistina, meio de Stuart modificado e meio de Cary e Blair. Entretanto, uma modificação do meio de Cary e Blair na qual é empregada a concentração de 1,6 g/L de ágar, vem demonstrando melhores resultados para a recuperação de *Campylobacter* e de outros enteropatógenos.

As amostras recebidas em meio de Cary e Blair devem ser armazenadas a 4°C se o processamento não for realizado imediatamente. O uso deste meio suplementado com sangue desfibrinado de carneiro pode ser útil para um armazenamento prolongado de amostras fecais e recuperação de *C. jejuni*.

Exame microscópico direto

As amostras fecais podem ser examinadas por meio de uma coloração simples como Gram (Figura 1), utilizando carbol fucsina ou solução aquosa a 0,1% de fucsina como corante para evidenciar o microrganismo e azul de metileno para identificar leucócitos e formas bacilares curvas.

A observação em microscópio de contraste de fase ou de campo escuro de bacilos curvos espiralados com grande motilidade em forma circular ou de saca-rolhas permite um diagnóstico presuntivo rápido.

Semeadura direta

Alíquotas de fezes diarreicas ou do *swab* de transporte podem ser semeadas, em duplicata, diretamente em placa de ágar seletivo para *Campylobacter*, porém normalmente se prepara uma suspensão em solução tampão (solução salina ou água peptonada de 0,1%) e se utiliza duas a três gotas desta suspensão para a semeadura. Não existe necessidade de pesar as fezes com precisão, contudo é indicado que a suspensão obedeça à proporção de 1/10 (p/v) para que se possa detectar a presença do microrganismo. As placas em duplicata deverão ser incubadas por 48 horas em microaerofilia nas temperaturas de 37°C e 42°C.

Método de filtração para a detecção de *Campylobacter* em fezes

Esta técnica foi desenvolvida por Steele e McDermott (1984), sendo baseada na separação do *Campylobacter* da flora bacteriana acompanhante. Nesta, os coliformes ficam retidos na superfície da membrana de celulose (0,45 mm ou 0,66 mm) enquanto os campilobacteres têm a capacidade de migrar pelos poros desta membrana e se depositarem sobre a placa que atuará como substrato para o seu crescimento. Este método é recomendado para o isolamento das espécies emergentes como *Campylobacter upsaliensis*.

Procedimento

Com auxílio de uma pinça colocar o filtro de celulose (0,45 mm) esterilizado na superfície de uma placa de ágar seletivo de modo que fique aderido ao meio. Preparar uma suspensão do material fecal em solução fisiológica e com auxílio de micropipeta, depositar 100 mL sobre a membrana, tendo cuidado para que a solução não derrame sobre o meio. Deixar filtrar por 30 minutos, adicionar mais 100 mL e esperar mais 30 minutos. Retirar a membrana (utilizando

uma pinça), descartá-la e estriar o filtrado com alça. Acondicionar as placas em jarras e incubar durante 24 a 48 horas, podendo esperar até quatro ou cinco dias, em microaerofilia a 37°C.

Observação: Se a amostra for proveniente de diarreia aquosa, não é necessário o preparo da suspensão.

Enriquecimento

Alimentos e amostras ambientais usualmente contêm um baixo número de células de *Campylobacter*. O uso de pré-enriquecimento no protocolo laboratorial parece aumentar a recuperação deste microrganismo (BOLTON; COATES; HUTCHINSON, 1984), tendo sido recomendado geralmente para a análise de alimentos, água e outras amostras ambientais.

O pré-enriquecimento usualmente começa com a restauração das células danificadas por procedimentos que envolvam secagem, aquecimento, congelamento e exposição ao oxigênio. O procedimento mais amplamente utilizado consiste de uma incubação a 37°C durante quatro horas (HUMPHREY, 1989; BOLTON, 2000) e, em seguida, a 42°C. É necessário que o tempo de 4 horas seja limitante para prevenir o crescimento exagerado de contaminantes (GOOSENS; BUTZLER, 1992).

Para amostras clínicas, alguns meios de enriquecimento vêm sendo apontados para permitir mais facilmente a recuperação de *Campylobacter* em fezes, incluindo o caldo Preston, o caldo Bolton, o *Campylobacter* Enrichment Broth e o caldo Park e Sanders. Estes são indicados para recuperar reduzido número de células resultante de transporte inadequado, após o estágio agudo da infecção. Entretanto, seu uso na rotina deve ser avaliado tendo em vista que os resultados apontados na literatura indicam sua utilização em reduzido número de amostras.

Em material fecal proveniente de pacientes previamente tratados com antibiótico, é necessário fazer uma etapa reconstituente da estrutura celular. Esta reconstituição deve ser realizada em meio contendo caldo *Brucella*, succinato de sódio a 0,3%, cisteína (0,01%) e uma mistura de antibióticos que não contenha antimicrobianos que exerçam efeito inibidor sobre as células injuriadas, como é o caso da polimixina e da rifampicina. A incubação deve ser a 37°C por um período de pelo menos seis horas.

Caldo Preston

As investigações realizadas por Bolton e Robertson (1982) revelaram que o Agar de Skirrow era insuficientemente seletivo para a recuperação de células de *Campylobacter* oriundas de amostras animais e ambientais e descreveram o meio Preston como uma alternativa efetiva. O meio de Preston pode ser usado tanto como um caldo para pré-enriquecimento quanto como um ágar para isolamento seletivo de colônias. O meio de Preston é baseado em um caldo nutriente que não possui extrato de levedura, um conhecido antagonista do trimetoprim, e inclui 5% (v/v) de sangue lisado de cavalo e os antibióticos polimixina B, rifampicina (usada para

suprimir o crescimento de bactérias Gram-positivas), trimetoprim e cicloheximida. A incubação é feita em atmosfera de microaerofilia a 42°C.

Uma modificação à formulação original de Preston foi a inclusão do piruvato de sódio, metabissulfito de sódio e sulfato ferroso – FBP. Esta inclusão permitiu a incubação aeróbica e também a estocagem do caldo por até sete dias a 4°C.

Atualmente, a formulação do caldo de Preston, acrescido do suplemento FBP, parece ser o mais amplamente usado (BAYLIS et al., 2000). Os componentes do caldo Preston estão disponíveis comercialmente e compreendem: caldo Preston desidratado, suplemento FBP, suplemento de antibióticos, em que a cicloheximida tem sido substituída pela anfotericina B e sangue de cavalo.

O protocolo para o pré-enriquecimento em caldo Preston usa incubação aeróbica a 37°C por 4 horas, seguida pela incubação a 42°C por 48 horas (BAYLIS et al., 2000).

Caldo Bolton

O caldo Bolton é recomendado nos protocolos produzidos pela Food and Drug Administration – FDA-USA (1998) para a recuperação de *Campylobacter* de uma grande variedade de tipos de amostras. O meio básico e os suplementos estão disponíveis comercialmente.

O caldo Bolton desidratado contém peptona e extrato de levedura, ácido alfa-cetoglutâmico, piruvato de sódio, metabissulfito de sódio, carbonato de sódio (serve para fornecer dióxido de carbono durante o crescimento) e hemina, que foi incluída para superar o antagonismo do trimetoprim ao extrato de levedura. O meio completo também inclui 5% de sangue de cavalo e os antibióticos cefoperazona, vancomicina, trimetoprim e cicloheximida.

O protocolo do FDA-USA (1998) especifica a necessidade de atmosfera em microaerofilia para a incubação. Para a maioria das amostras, o período de recuperação das células consiste de uma incubação a 37°C durante quatro horas, sendo transferido em seguida para uma incubação a 42°C durante 28 a 29 horas para a maioria dos tipos de amostras e 44 horas para produtos lácteos. Na análise de mariscos, a primeira incubação é realizada à 30°C por três horas, seguida de 37°C por 2 horas e, finalmente, a 42°C durante 48 horas.

***Campylobacter* Enrichment Broth – CEB**

Este caldo pode ser encontrado comercialmente e possui a mesma formulação do caldo Bolton, variando apenas na composição do suplemento de antibióticos em que a natamicina substitui a cicloheximida.

Observação: Caldos de pré-enriquecimento que contenham o suplemento FBP podem ser incubados aerobicamente (em tubos ou frascos com espaço de cabeça < 1 cm) por 4 horas, a 37°C, para permitir a recuperação das células, seguida por outra incubação de 20 a 44 horas, a 42°C (BAYLIS et al., 2000).

Caldo Park e Sanders

A formulação básica do caldo Park e Sanders é o Caldo Brucella (Difco) contendo peptonas, glicose, extrato de levedura, piruvato de sódio metabissulfito de sódio. Antes da inoculação da amostra devem ser adicionados ao meio 5% de sangue lavado de cavalo (v/v) e dois antibióticos, vancomicina e trimetoprim (ambos na concentração de 10mg/L). O período inicial de incubação é de 4 horas a 32°C, após o qual dois outros antibióticos, cefoperazona (32mg/L) e cicloheximida (100mg/L), também são adicionados ao caldo que deve ser transferido para a temperatura de 37°C durante 4 horas. Decorrido o tempo, o caldo deverá ser transferido novamente para 42°C em um período de 40 a 42 horas.

Todas as três etapas de incubação devem ser realizadas em atmosfera de microaerofilia de acordo com a *International Organization for Standardization* (ISO 10272-1, 2006). O uso deste meio é recomendado para amostras submetidas a tratamentos que podem ocasionar algum tipo de estresse nas células, como o congelamento.

Semeadura em ágar seletivo

Após o pré-enriquecimento, quando necessário, o isolamento é realizado por meio de semeadura por estrias em placas de ágar seletivo para *Campylobacter*, utilizando swabs esterilizados. Na maioria dos protocolos, uma alçada do crescimento em caldo é estriada na superfície da placa de ágar seletivo, de forma a obter colônias isoladas. Existe uma variedade de meios seletivos para *Campylobacter*.

Embora numerosas formulações de meios tenham sido descritas na literatura, ressalta-se aquelas que tenham sido usadas recente ou frequentemente:

- Meios que incluem sangue (usualmente 5% a 7% v/v) lavado de cavalo: skirrow, campy-cefex, butzler (ou butzler modificado), Preston e Exeter;
- Meios livres de sangue: Agar Karmali ou mCCDA – modified Charcoal, Cefoperazone, Deoxicolato Ágar (Figura 2).

Amostras de alimentos

As técnicas de isolamento de *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* em alimentos necessitam de meios de enriquecimento para recuperação das células lesadas metabolicamente. Os alimentos a serem analisados podem estar altamente contaminados com flora competitiva tornando difícil o isolamento de *Campylobacter*. Além disso, o número do microrganismo pode estar presente em pequena quantidade ou as células podem estar injuriadas como consequência das condições ambientais de armazenamento e processamento (aquecimento, dessecação, congelamento e acidificação).

Em geral, são incorporados antibióticos nos meios de cultura como agentes seletivos entre os quais trimetoprim, vancomicina, anfotericina, cefalotina, polimixina B, actidiona, colistina e

rifampicina. São adicionados também suplementos como: sulfato ferroso, metabissulfito de sódio, piruvato de sódio (suplemento FBP), cisteína, hematina, sangue de cavalo e extrato de levedura.

Alimentos congelados ou refrigerados devem ser pré-incubados por pelo menos 6 horas a 37°C em microaerofilia, evitando-se os meios que contenham polimixina ou rifampicina, uma vez que células submetidas ao frio sofrem alterações tornando-se sensíveis à temperatura de 42°C e a esses antibióticos.

Amostras embaladas podem ser conservadas refrigeradas e protegidas do ar por uma a três semanas. Após a abertura da embalagem, a amostra deve ser analisada, pois a introdução do oxigênio provoca dano celular.

Enriquecimento seletivo

- Carnes bovina, suína ou aves

Para análise destes alimentos, alíquotas de 25g da amostra devem ser homogeneizadas em 100mL de caldo de enriquecimento seletivo, seguindo-se a incubação a 42°C por 48 horas em atmosfera de microaerofilia. Para carcaças, podem ser utilizadas lavagens com água peptonada tamponada (carcaças de 1kg a 2 kg utilizar 100mL a 400mL do diluente), sendo retirados 25mL da rinsagem e colocados em 25mL de meio de enriquecimento em concentração dupla.

- Alimentos congelados

Park e Sanders desenvolveram um método de enriquecimento seletivo com uma etapa de reparação de células injuriadas que é recomendado pelos autores para frangos congelados. A preparação da amostra deve ser efetuada conforme procedimento descrito no item anterior empregando, para tal, caldo de enriquecimento isento de agentes seletivos. As amostras coletadas devem ser submetidas a uma incubação inicial de 31°C a 32°C durante três ou quatro horas em atmosfera de microaerofilia, sem agitação, seguindo-se a adição da cefoperazona (32mg/l) e da cicloheximida (100mg/l), com nova incubação, sem agitação, em microaerofilia a 35°C-37°C por duas horas e em seguida, incubação a 42°C por um período de 40 a 42 horas sob agitação.

- Alimentos líquidos com exceção da água

A análise de alimentos líquidos deve ser precedida de centrifugação de 250mL da amostra a 16.000 x g durante 20 minutos a 4°C. O sobrenadante deve ser desprezado e o precipitado suspenso em 2mL a 5mL de caldo de enriquecimento. Em seguida, proceder conforme metodologia descrita no item 1.

- Água

Para isolamento da bactéria em amostras de água é necessário que se realize a filtração de um grande volume de água (1 litro a 4 litros) em membrana filtrante que, após a filtragem, deve ser colocada em um meio de enriquecimento seletivo e este, incubado de 24 a 48 horas a 42°C em microaerofilia. O crescimento obtido deverá ser semeado em ágar seletivo. Se a água for

clorada, devem ser adicionados 5mL de tiosulfato de sódio 1M por litro de água no momento da coleta. Para água do mar ou com alto teor de sal, lavar o filtrado com 100mL a 1000mL de tampão fosfato estéril. *Campylobacter* é sensível a altas concentrações de sal. Para isolar esse microrganismo de rios, o uso de mecha de Moore também é recomendável.

Semeadura em meios sólidos diferenciais

A partir do caldo de enriquecimento, estriar uma alçada em placa de Agar Blaser (Campy-BAP) e uma alçada em placa de Agar *Campylobacter* Charcoal Diferencial – CCDA. Opcionalmente, podem ser utilizados o Ágar Skirrow e o Ágar Butzler em substituição ao CCDA ou Campy-BAP. Acondicionar as placas em jarra com atmosfera de microaerofilia e incubar a 42°C.

Exame das placas

O tempo de incubação ideal é de 48 horas, porém podem ser examinadas em 18-24 horas. As colônias suspeitas de *Campylobacter* nos diversos meios são semelhantes, podendo ser lisas, convexas e brilhantes, com bordas perfeitas, ou planas, translúcidas e lustrosas, com bordas irregulares e tendência a disseminar-se pela placa. Geralmente são incolores, com tonalidades creme ou acinzentada cujo diâmetro das colônias varia de 1mm a 2mm, podendo ainda apresentar-se puntiformes. Nos meios contendo sangue (Ágar, segundo Blaser, Skirrow ou Butzler) não existe a presença de hemólise.

Identificação presuntiva do gênero

As colônias suspeitas devem ser submetidas ao exame de morfologia microscópica pela coloração de Gram, em que a safranina é substituída pelo carbol fucsina. As espécies do gênero *Campylobacter* são Gram-negativos (Figura 1), bacilos curvos, espiralados, muito finos e compridos (0,20µm a 0,50µm de largura e 0,5µm a 5,0µm de comprimento). Em culturas jovens é possível a observação da morfologia em forma de asa de gaivota, “S” ou cedilha.

O movimento típico em “saca-rolha” deverá ser visualizado em microscopia de contraste de fase, pelo esfregaço da colônia em lâmina de vidro com solução salina 0,9%.

Confirmação

Colônias que apresentarem características compatíveis ao gênero *Campylobacter* deverão ser submetidas ao teste de sensibilidade aos antibióticos cefalotina (30mg) e ácido nalidíxico (30mg), assim como às seguintes provas para a caracterização final: catalase, oxidase, fermentação da glicose, redução de nitrato, produção de H₂S, hidrólise do hipurato.

- Teste de catalase

Colocar uma gota de peróxido de hidrogênio em uma lâmina de vidro; adicionar à gota o crescimento bacteriano proveniente da placa, com o auxílio de uma alça de platina ou plástica. A positividade do teste é verificada pela formação de bolhas no período de até 30 segundos (Figura 3).

- Teste de oxidase

Adicionar uma gota de reagente (solução aquosa de dimetil- ρ -fenilenodiamina) em uma tira de papel de filtro, previamente esterilizada. Com o auxílio de um palito de madeira, plástico ou alça de platina, espalhar a amostra a ser testada sobre o papel impregnado com o reagente. O resultado positivo é observado pelo aparecimento de cor roxa (Figura 4). A reação deve ser interpretada em 10 a 20 segundos após a semeadura, visto que alguns membros das enterobacteriáceas podem produzir reações falso-positivas tardias.

- Termotolerância

Semear a amostra, a partir de uma suspensão com turvação equivalente ao padrão 1 da escala de McFarland, preparada em solução fisiológica esterilizada, em três placas de ágar sangue ou ágar seletivo para *Campylobacter*. Incubar em atmosfera de microaerofilia cada placa nas temperaturas de 25°C, 37°C e 42°C, respectivamente. Examinar, após três dias, a presença de colônias típicas de *Campylobacter*.

Uma alternativa é o uso de 0,5mL desta suspensão em tubos contendo caldo *Brucella*. Após os mesmos períodos de incubação, verificar o crescimento bacteriano pela turvação do caldo.

- Teste de sensibilidade a antibióticos (ácido nalidíxico e cefalotina)

Preparar uma suspensão correspondente ao padrão 1 da escala de McFarland, a partir do crescimento bacteriano em 5mL de água peptonada 0,1%. Semear, com auxílio de um *swab*, toda a superfície de uma placa de ágar sangue, Ágar Muller Hinton ou outro meio seletivo para o crescimento de *Campylobacter*. Colocar sobre a semeadura os discos dos antibióticos em teste, incubar em microaerofilia a 37°C de 24 a 48 horas. A sensibilidade é verificada pela formação de qualquer halo de inibição.

- Hidrólise do hipurato

Preparar uma suspensão do crescimento em 0,4mL de uma solução de hipurato de sódio a 1%. Colocar os tubos em banho-maria a 37°C durante duas horas, sob agitação.

Preparar uma solução de ninhidrina a 3,5% em butanol/acetona (1:1).

Após a retirada dos tubos da incubação, adicionar 0,2mL da solução de ninhidrina, agitar e reincubar por mais 10 minutos, sem agitação. A positividade do teste é verificada pela formação de coloração violeta nos tubos (Figura 5).

- Hidrólise do indoxil-acetato

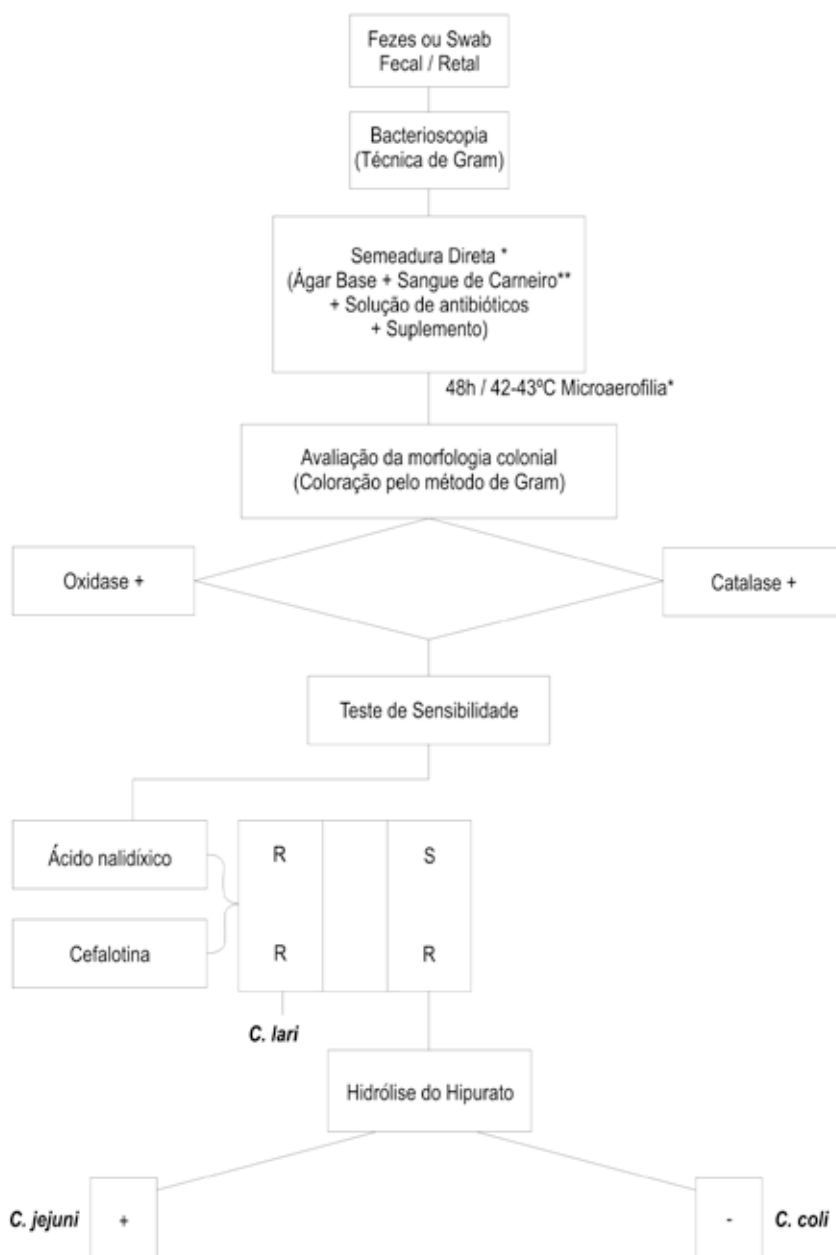
Preparar uma solução a 10% em acetona (p/v). Impregnar discos de 6mm de diâmetro com 50 μ l da solução e deixar secar.

Preparar uma suspensão em 0,3mL de água destilada, a partir do crescimento em placa. Adicionar um disco a cada tubo e aguardar por um período de 10 a 15 minutos. O aparecimento de coloração azul indica a hidrólise do composto (Figura 6).

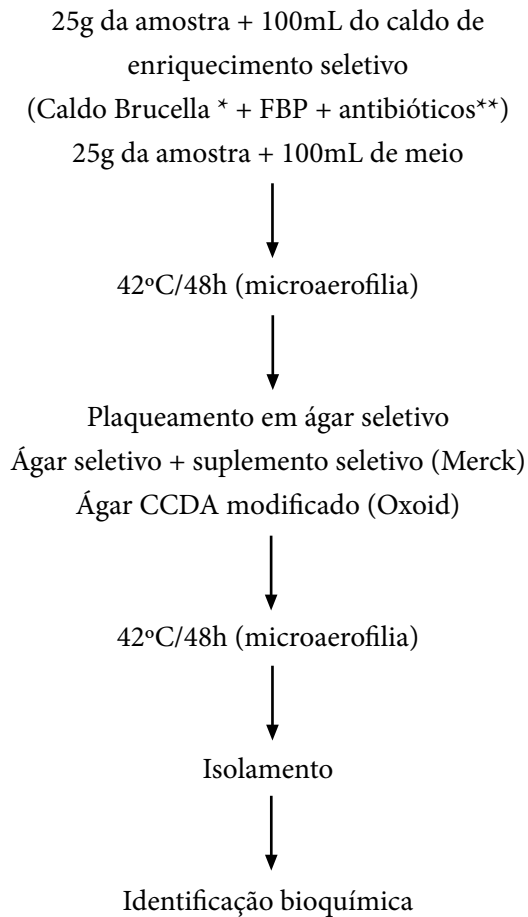
- Produção de H₂S

Inocular a amostra com uma picada no centro da coluna do tubo de meio para H₂S (ágar TSI) e incubar a 37°C em atmosfera de microaerofilia por até cinco dias. A positividade do teste é verificada pelo enegrecimento do meio ao redor do inóculo.

DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DE *CAMPYLOBACTER* SPP. EM AMOSTRAS CLÍNICAS



Isolamento e identificação de *Campylobacter* em alimentos



*Substituído por TSB 30g

Extrato de levedura 2g

Citrato de sódio 1g

**Suplemento seletivo da cefar (vancomicina, trimetoprim, polimixina B, cefalotina, anfotericina)

Quadro 1 - Propriedades fenotípicas de *Campylobacter* spp. prevalentes no homem

Prova	<i>C.fetus ssp.fetus</i>	<i>C.hyointestinalis</i>	<i>C.jejuni ssp.jejuni</i>	<i>C.jejuni ssp.doylei</i>	<i>C.coli</i>	<i>C.lari</i>	<i>C.upsaliensis</i>
Catalase	+	+	+	V	+	+	-
Redução de NO ₃	+	+	+	-	+	+	+
Produção de H ₂ S (TSI)	-	+	-	-	V	-	-
Hidrólise do:							
hipurato	-	-	+	V	-	-	-
indoxilacetato	-	-	+	+	+	-	+
Crescimento :							
25°C	+	V	-	-	-	-	-
37°C	+	+	+	+	+	+	+
42°C	-	V	+	-	+	+	V
Sensibilidade:							
Ácido nalidíxico	V	R	S	S	S	R	S
Cefalotina	S	S	R	S	R	R	S

R = Resistente S = Sensível V = Variável

Fonte: lorem ipsum lorem

Quadro 2 - Características de espécies da família *Campylobacteriaceae*

	Catalase	Redução Nitrito	Redução Nitrito	Urease	H ₂ S (TSI)* **	Hidrólise Hipurato	Crescimento 15°C	Crescimento 25°C	Crescimento 42°C	Crescimento 3,5% NaCl	Crescimento 1% Glicina	Ágar Mac Conkey	Sensibilidade Ac. Nalidíxico	Sensibilidade Cefalotina
<i>C. jejuni subsp. jejuni</i>	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	S	R
<i>C. jejuni subsp. doviei</i>	v	-	-	-	-	v	-	-	-	-	+	-	S	S
<i>C. coli</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	S	R
<i>C. fetus subsp. fetus</i>	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	v	S
<i>C. fetus subsp. veneralis</i>	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	R	S
<i>C. lari</i>	+	+	-	v	-	-	-	-	+	-	+	+	R	R
<i>C. upsaliensis</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	v	+	S	S*
<i>C. hyointestinalis</i>	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	R	S

(continua)

(continuação)

	Catalase	Redução Nitrato	Redução Nitrito	Urease	H ₂ S (TSI)**	Hidrólise Hipurato	Crescimento 15°C	Crescimento 25°C	Crescimento 42°C	Crescimento 3,5% NaCl	Crescimento 1% Glicina	Ágar Mac Con key	Sensibilidade Ac. Nalidixico	Sensibilidade Cefalotina
<i>C. sputorum</i> biovar <i>sputorum</i>	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+	S	S
<i>C. sputorum</i> biovar <i>bubulus</i>	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	R	S
<i>C. sputorum</i> biovar <i>fecalis</i>	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+	R	S
<i>C. helveticus</i>	-	+	ND	ND	-	-	-	-	+	v	v	ND	S	S
<i>C. mucosalis</i>	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+	R	S
<i>C. concisus</i>	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+	R	R
<i>C. curvus</i>	-	+	+	-	=	-	-	-	+	-	+	ND	S	ND
<i>C. rectus</i>	-	+	+	-	+	-	-	-	+*	-	+	ND	S	ND
<i>C. showae</i>	+	+	ND	-	+	-	-	-	+	-	v	ND	R	S
<i>Arcobacter cryaerophilus</i> grupo 1A	+	v	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	v	R
<i>A. cryaerophilus</i> grupo 1B	+	v	ND	-	-	-	+	+	-	-	-	+	S	v
<i>A. nitrofigilis</i>	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	S	S
<i>A. butzleri</i>	+*	+	-	-	-	-	+	+	v	v	+	+	S	R
<i>A. skirrowii</i>	+	+		-	-	-	+	+	v	v	v	-	S	S

* (reação fraca) S (sensível) + (positivo) v (reação variável) R (resistente)
 - (negativo) ND (Não determinado)

** TSI (Ágar três açúcares e ferro)

Fonte: (FITZGERALD, C.; NACKAMKIN, I., 2007)

Identificação molecular de *Campylobacter* spp.

PCR – Multiplex para diferenciação de *C. jejuni* e *C. coli*

Os métodos clássicos de identificação de *C. jejuni* e *C. coli* são muito lentos, já que na maioria dos testes são necessários cinco dias para isolamento e caracterização do microrganismo. Além disso, a diferenciação de *C. jejuni* de outros microrganismos do mesmo gênero é baseada no teste da hidrólise do hipurato, o que nem sempre permite definir uma identificação precisa, visto que já existem relatos sobre cepas de *C. jejuni* com ausência da enzima hipuricase.

Tendo em vista tais dificuldades com os testes fenotípicos para a caracterização em nível de espécie de *Campylobacter* e o baixo espectro de provas bioquímicas aplicadas para este fim, muitos laboratórios têm utilizado ensaios baseados na biologia molecular para uma identificação específica destes microrganismos.

O uso da reação de PCR, aplicada para a diferenciação das duas espécies de *Campylobacter*, mais comumente implicadas em gastroenterite de origem alimentar no homem, é realizado segundo o protocolo da WHO, 2003.

Extração do DNA

A extração do DNA de cepas de *Campylobacter* pela técnica de fervura é bastante eficiente. Para tal, preparar uma suspensão bacteriana a partir da raspagem de colônias crescidas em ágar sangue a 42°C, por 24 horas (microaerofilia), em 1mL de solução fisiológica e ajustar a uma DO de 625nm.

Transferir a suspensão para um tubo de 1,5mL, agitar em vortex e centrifugar a 11.000 x g durante 5-8 minutos. Descartar o sobrenadante e suspender o *pellet* em 200µl de água deionizada. Submeter os tubos à fervura (100°C) durante 10 minutos e, em seguida, mantê-los a -20°C até a sua utilização no ensaio.

Reação da PCR

O ensaio é realizado para um volume final de 25 µl/amostra, cuja distribuição de volume dos reagentes encontra-se listada a seguir:

Quadro 3 - Volume dos reagentes empregados no preparo da mistura para amplificação

Reagentes	Volume (µl)	Concentração final
Água deionizada	5,25	
Tampão 50mm Tris-HCl 10X	2,5	1X
dNTP (mix)	2,0	
Primer Jun3	2,5	1,0 µM
Primer Jun4	2,5	1,0 µM
Primer Col1	2,5	1,0 µM
Primer Col2	2,5	1,0 µM
Taq DNA polimerase	0,25	1,25 U/ensaio
DNA	5,0	≈ 100 ng
Volume final	25,0	

Fonte:

Sequências nucleotídicas utilizadas em pcr para *Campylobacter*

Primer Col 1: 5' AGG CAA GGG AGC CTT TAA TC 3'

Primer Col 2: 5' TAT CCC TAT CTA CAA ATT CGC 3'

Primer Jun 3: 5' CAT CTT CCC TAG TCA AGC CT 3'

Primer Jun 4: 5' AAG ATA TGG CAC TAG CAA GAC 3'

Amplificação

- As condições de amplificação no termociclador devem ser determinadas segundo o protocolo: desnaturação: 94°C/5min
- dois ciclos: 94°C/1min; 64°C/1min; 72°C/1min
- dois ciclos: 94°C/1min; 62°C/1min; 72°C/1min
- dois ciclos: 94°C/1min; 60°C/1min; 72°C/1min
- dois ciclos: 94°C/1min; 58°C/1min; 72°C/1min
- dois ciclos: 94°C/1min; 56°C/1min; 72°C/1min
- 30 ciclos: 94°C/1min; 54°C/1min; 72°C/1min
- Extensão final: 72°C/10min. Manter a 4°C.

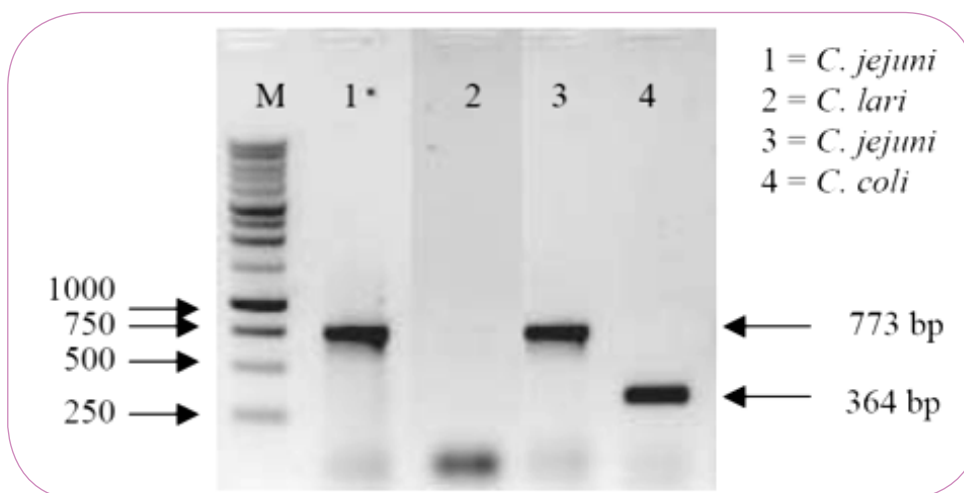
Além das amostras para análise, devem ser adicionados controles negativo, para evitar contaminação (água deionizada), e positivo, para controle de reações falso-positivas (DNA conhecido).

Após a amplificação, deve ser realizada uma corrida eletroforética em gel de agarose a 2% em tampão TBE 1x durante 40 minutos com potência de 100v. Para preparo do gel de agarose, preparar a solução e aquecer em banho-maria para fusão do ágar, vertendo a seguir sobre o suporte específico. Deixar resfriar por 20-30 minutos.

A coloração do gel deve ser realizada com solução aquosa de brometo de etídio (1µg/mL) por 30 minutos, sendo posteriormente visualizado sob luz UV.

Os tamanhos dos fragmentos amplificados são: 773 pb para *C. jejuni* e 364 pb para *C. coli*.

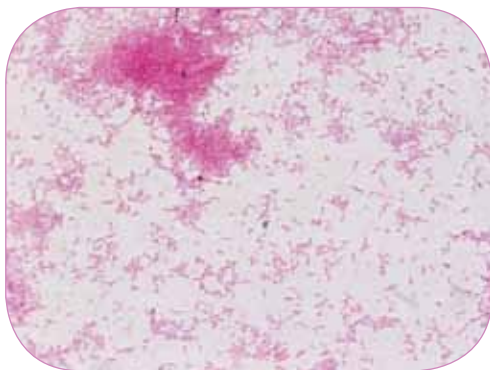
PCR-Multiplex: tamanho dos fragmentos amplificados



Fonte: (LABENT; IOC; FIOCRUZ)

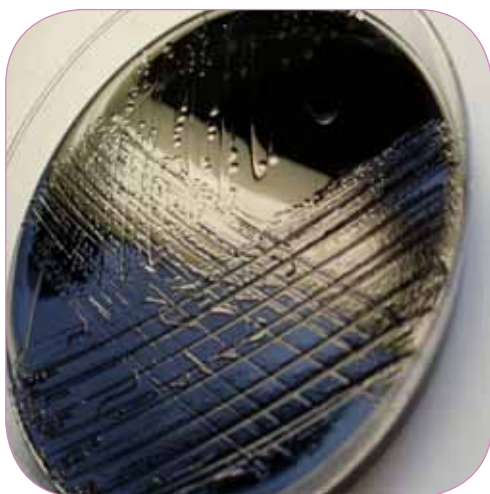
9 Figuras

Figura 1 - *Campylobacter jejuni* coloração pelo método de Gram



(http://aapredbook.aappublications.org/content/images/large/2009/1/022_04.jpeg)

Figura 2 – Crescimento de *Campylobacter* em Ágar modificado de carvão, cefoperazona e desoxicolato (mCCDA)



(LRNEB/IOC/FIOCRUZ)

Figura 3 - Teste para presença da enzima catalase



Figura 4 - Teste para presença da enzima citocromo oxidase



Figura 5 - Hidrólise do hipurato de sódio



Figura 6 - Hidrólise do indoxil-acetato



Referências

- BAYLIS, C. L. et al. Comparison of three enrichment media for the isolation of *Campylobacter* spp. from foods. **Journal of Applied Bacteriology**, London, n. 89, p. 884-891, 2000.
- BLACK, R. E. et al. Experimental *Campylobacter jejuni* infection in humans. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, n. 157, p. 472-479, 1988.
- BLASER, M. J. *Campylobacter* and related species. In: MANDEL, G. L.; BENNETT, J. E.; DOLIN, P. (Ed.). **Principles and Practice of Infectious Diseases**. New York: Churchill Living-stone, 1995, p. 1948-1956.
- BOLTON, F. J. Methods for isolation of *Campylobacter* from humans, food and water. In: WORLD HEALTH ORGANIZATION. Department of Communicable Disease Surveillance and Response. **The increasing incidence of human campylobacteriosis: Report and proceedings of a WHO Consultation of Experts**. Copenhagen, Denmark, 21-25 Nov. 2000. Geneva, 2000. p. 87-93.
- BOLTON, F. J.; ROBERTSON, L. A selective medium for isolating *Campylobacter jejuni*. In: NEWELL, D. G. (Ed.). **Campylobacter: Epidemiology, pathogenesis and biochemistry**. Lancaster: MTP Press, 1982. p. 75-76.
- BOLTON, F. J.; COATES, D.; HUTCHINSON, D. N. The ability of *Campylobacter* supplements to neutralize photochemically induced toxicity and hydrogen peroxide. **Journal of Applied Bacteriology**, London, n. 56, p. 151-157, 1984.
- DOYLE, L. P. A *Vibrio* associated with swine dysentery. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, n. 5, p. 3-5, 1944.
- DOYLE, M. P.; JONES, D. M. Food-borne transmission and antibiotic resistance of *Campylobacter jejuni*. In: NACHAMKIN, I.; BLASER, M. J.; TOMPKINS, L. S. (Ed.). **Campylobacter jejuni: current status and future trends**. Washington: ASM Press, 1992, p. 45-48.

ENGBERG, J. et al. Prevalence of *Campylobacter*, *Arcobacter*, *Helicobacter*, and *Sutterella* spp. in human fecal sample as estimated by a reevaluation of isolation methods for *Campylobacter*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, DC, n. 38, p. 286-291, 2000.

EUZÉBY, J.P. **List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature - Genus *Campylobacter***. 2011 Disponível em: <<http://www.bacterio.cict.fr/c/campylobacter.html#r>>. Acesso em: 01 fev. 2011.

FITZGERLD, C.; NACHAMKIN, I. *Campylobacter* and *Arcobacter*. In: MURRAY, P. R. et al. **Manual of clinical microbiology**. 9th ed. Washington, DC: ASM Press, 2007. v. 1. p. 933-946.

GOOSENS, H.; BUTZLER, J. P. Isolation and identification of *Campylobacter* spp. In: NACHAMKIN, I.; BLASER, M. J.; TOMPKINS, L. S. (Ed.). ***Campylobacter jejuni*: Current status and future trends**. Washington, DC: ASM, 1992. p. 93-109.

GOOSENS, H. et al. Is *Campylobacter upsaliensis* an unrecognized cause of human diarrhoea? **Lancet**, London, n. 335, p. 584-586, 1990.

HUMPHREY, T. J. An appraisal of the efficacy of pre-enrichment for the isolation of *Campylobacter jejuni* from water and food. **Journal of Applied Bacteriology**, London, v. 66, n. 2, p. 119-126, 1989.

_____. The synergistic inhibition of *Campylobacter jejuni* by rifampicin and hydrogen peroxide. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, n. 10, p. 97-100, 1990.

HUMPHREY, T. J.; CRUICKSHANK, J. G. Antibiotic and deoxycholate resistance in *Campylobacter jejuni* following freezing or heating. **Journal of Applied Bacteriology**, London, n. 59, p. 65-71, 1985.

HUNT, J. M.; ABEYTA, C.; TRAN, T. **FDA's bacteriological analytical manual (BAM)**. 8th ed., revision A. Silver Spring, 1998. Chapter 7. 23 p.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 10272-1**. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of *Campylobacter*. Part 1: Detection Method. 1ª ed. Geneva. 2006.

JOHNSON, W. M.; LIOR, H. Cytotoxic and cytotoxic factors produced by *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* and *Campylobacter laridis*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, DC, n. 24, p. 275-281, 1986.

JONES, F. Vibrios (*Vibrio jejuni*, n. sp) associated with intestinal disorders of cows and calves. **The Journal of Experimental Medicine**, New York, n. 53, p. 853-854, 1931.

KING, E. O. Human infections with *Vibrio fetus* and a closely related *Vibrio*. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, n. 101, p. 119-128, 1957.

KIST, M. Te historical background of *Campylobacter* infection: new aspects. In: PEARSON, A. D. **Proceedings of the 3rd International Workshop on *Campylobacter* Infections**. Ottawa, 1985. London: Public Health Laboratory Service, 1985. p. 23-27.

LEE, A. et al. Mucus colonization as a determinant of pathogenicity in intestinal infection by *Campylobacter jejuni*: a mouse cecal model. **Infection and Immunity**, Washington, DC, n. 51, p. 828-831, 1986.

MARTIN, K. W. et al. A *Campylobacter* medium for all seasons? In: NEWELL, D. G.; KETLEY, J. M.; FELDMAN, R. A. **Campylobacters, Helicobacters and related organisms**. New York: Plenum Press, 1996. p. 61-65.

_____. Evaluation of selective media for *Campylobacter* isolation when cycloheximide is replaced with amphotericin B. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, n. 34, p. 124-129, 2002.

NACHAMKIN, I.; ENGBERG, J.; AARESTRUP, F. M. Diagnosis and antimicrobial susceptibility of *Campylobacter* species. In: NACHAMKIN, I; BLASER, M. J. (Ed.). **Campylobacter**. 2nd ed. Washington, DC: ASM Press, 2000. p. 45-66.

ON, S. L. W. Taxonomy of *Campylobacter*, *Arcobacter*, *Helicobacter* and related bacteria: current status, future prospects and immediate concerns. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, n. 90, p. 1S-15S, 2001.

PARK, P. The physiology of *Campylobacter* species and its relevance to their role as food borne pathogens. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, n. 74, p. 177-188, 2002.

POST, D. E. **Food-borne pathogens**. Basingstoke: Unipath, 1995. 33 p. (Monograph, n. 3: *ampylobacter*).

RAMS, T. E.; FEIK, D.; SLOTS, J. *Campylobacter rectus* in human periodontitis. **Oral Microbiology and Immunology**, Copenhagen, n. 8, p. 230-235, 1993.

ROBINSON, D. A. Infective dose of *Campylobacter jejuni* in milk. **British Medical Journal**, London, n. 282, p. 1584, 1981.

RUIZ-PALACIOS, G. M. et al. Cholera-like enterotoxins produced by *Campylobacter jejuni*: Characterization and clinical significance. **Lancet**, London, v. 2, p. 250-252, 1983.

SKIRROW, M. B.; BLASER, M. J. Clinical aspects of *Campylobacter* infection. In: NACHAMKIN, I; BLASER, M. J.; TOMPKINS, L. S. ***Campylobacter jejuni*: current strategy and future**. Washington, DC: ASM Press, 2000. p. 69-88.

- SKIRROW, M. B. et al. Campylobacter bacteremia in England and Wales, 1981-1991. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, n. 110, p. 567-573, 1993.
- STEELE, T. W.; MCDERMOTT, S. N. The use of membrane filters applied directly to the surface of agar plates for the isolation of Campylobacter jejuni from feces. **Pathology**, London, n. 16, p. 263-265, 1984.
- STEELE, T. W.; OWEN, R. J. Campylobacter jejuni subspecies doylei (subsp. nov.), a subspecies of nitrate-negative campylobacters isolated from human clinical specimens. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Ames, n. 38, p. 316-318, 1988.
- TAUXE, R. V. Epidemiology of Campylobacter jejuni infections in the United States and other industrial nations. In: NACHAMKIN, I.; BLASER, M. J.; TOMPKINS, L. S. (Ed.). **Campylobacter jejuni: current and future trends**. Washington: ASM Press, 1992. p. 9-12.
- THEOBALD, S. M. D. et al. Further studies on the etiological rôle of vibrio fetus. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 32, p. 683-689, 1920.
- VANDAMME, P. Taxonomy of the family Campylobacteraceae. In: NACHAMKIN, I.; BLASER, M. J. (Ed.). **Campylobacter**. 2nd ed. Washington, DC: ASM Press, 2000. p. 3-26.
- VANDAMME, P. et al. Revision of Campylobacter, Helicobacter, and Wollinella taxonomy: emendatum of genetic descriptions and proposals of Arcobacter gen. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Ames, n. 41, p. 88-103, 1991.
- VAN ETTERIJCK, R. et al. Isolation of Campylobacter concisus from feces of children with and without diarrhea. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, DC, n. 34, p. 2304-2306, 1996.
- VELASQUEZ, J. B. et al. Incidence and transmission of antibiotic resistance in Campylobacter jejuni and Campylobacter coli. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, n. 35, p. 173-178, 1995.
- VÉRON, M.; CHATERLAIN, 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. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Ames, n. 23, p. 122-134, 1973.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global Salm-Surv Laboratory Protocols**. Multiplex PCR for differentiation of *C. coli* and *C. jejuni*. Ed. J. Wagenaar & M. VanBergen. 18p. 2003.

ISBN 978-85-334-1793-9



Disque Saúde

0800.61.1997

Biblioteca Virtual em Saúde do Ministério da Saúde

www.saude.gov.br/bvs

Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde

www.saude.gov.br/svs



Secretaria de
Vigilância em Saúde

Ministério da
Saúde

