



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

JULIANE ALVES

**PCR MULTIPLEX PARA DETECÇÃO DE *Campylobacter*  
spp. E *Salmonella* spp. EM CARNE DE FRANGO**

---

Londrina  
2010

JULIANE ALVES

**PCR MULTIPLEX PARA DETECÇÃO DE *Campylobacter*  
spp. E *Salmonella* spp. EM CARNE DE FRANGO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, nível Mestrado, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Tereza Cristina Rocha Moreira de Oliveira

Londrina  
2010

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da  
Universidade Estadual de Londrina**

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

A474p Alves, Juliane.  
PCR multiplex para detecção de *Campylobacter* spp. e *Salmonella* spp. em carne de frango / Juliane Alves. – Londrina, 2010.  
61 f. : il.

Orientador: Tereza Cristina Rocha Moreira de Oliveira.  
Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, 2010.  
Inclui bibliografia.

1. Reação em cadeia de polimerase – Teses. 2. Alimentos – Microbiologia – Teses. 3. Carne de ave – Doenças – Teses. 4. Salmonela – Teses. 5. Campylobacter – Teses. I. Oliveira, Tereza Cristina Rocha Moreira de. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos. III. Título.

CDU 641:579

JULIANE ALVES

**PCR MULTIPLEX PARA DETECÇÃO DE *Campylobacter* spp. E  
*Salmonella* spp. EM CARNE DE FRANGO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, nível Mestrado, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Tereza Cristina Rocha Moreira de  
Oliveira  
UEL – Londrina – PR

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Renata Katsuko Takayama Kobayashi  
UEL – Londrina – PR

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Sueli Fumie Yamada Ogatta  
UEL – Londrina – PR

Londrina, 15 de dezembro de 2010.

## **Dedico**

*Aos grandes amores da minha vida, meus Pais,  
que sempre estiveram presentes me apoiando  
e incentivando em todos esses anos de  
estudos.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por mais essa conquista.

A minha orientadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Tereza Cristina Rocha Moreira de Oliveira, pelo incentivo, disponibilidade, paciência, comentários críticos, dedicação e sobretudo pela amizade.

A Universidade Estadual de Londrina, pelas oportunidades.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de estudo.

Ao Prof Dr Luiz Filipe Protasio Pereira, do Laboratório de Biotecnologia Vegetal do IAPAR, por me receber no laboratório e pela disponibilidade de equipamentos.

A Dr<sup>a</sup> Viviani Vieira Marques Marçal, do Laboratório de Biotecnologia Vegetal do IAPAR, pelas orientações no início do trabalho com biologia molecular e pela amizade.

A Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Elisa Yoko Hirooka, pela disponibilidade de seus equipamentos e pelas valiosas sugestões no exame de qualificação.

A Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Gislayne Trindade Vilas-Bôas, por ter participado da banca de qualificação e pelas inúmeras dicas.

A Dr<sup>a</sup> Ana Luzia Lauria Filgueiras e Sheila da Silva Duque, FIOCRUZ, pela imensa boa vontade em doar as cepas de *Campylobacter* spp. para o desenvolvimento desse trabalho.

Aos professores do programa de Mestrado e Doutorado em Ciência de Alimentos, pelo conhecimento transmitido e dedicação.

Aos técnicos e funcionários do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos (CCA/UEL), pela colaboração.

A Gislaine Vasques de Souza, do Laboratório de Biotecnologia Vegetal do IAPAR, pela sua atenção e disponibilidade em me ajudar no laboratório.

A Kérley Braga Pereira Bento Casaril pela amizade e por ter me apresentado à Ciência de Alimentos.

A Natália Harumi Niguma e Leniza Januário Ludwig pela grande ajuda no laboratório, pelo carinho e amizade.

A Thalyta Marina Benetti, Erika Kushikawa Saeki, Raissa Curti Bonfante pela companhia e ajuda nessa reta final.

A Fernanda Gonzales Paião e Giselle Nobre pelas dicas no laboratório.

Aos colegas de curso, pelas conversas produtivas (ou nem tanto) enquanto tinha que esperar a autoclave, o termociclador, os géis... pela amizade durante os anos do mestrado, pelas saídas nos finais de semana e animados churrascos.

A amiga querida Talita Perdigão pelo convívio e por todos os momentos compartilhados ao longo desses anos de graduação e pós-graduação.

A minha Mãe, Julcinéia Alves, pelo amor, colo, carinho, cuidado, dedicação e orações.

Ao meu Pai, Romerito Alves, pelo amor, carinho, pelo incentivo e apoio em todas as minhas escolhas, pelo investimento em toda minha vida acadêmica e pelas idas ao mercado para comprar as amostras de frango!

Ao Juscélio Cardoso, pelo amor, amizade, incentivo, compreensão nas horas de estresse extremo, dicas de biologia molecular e companhia no laboratório quando precisava ficar fora de hora.

A todos que tenham auxiliado de alguma forma na realização deste trabalho.

**"A persistência é o caminho do êxito"**  
Charles Chaplin

ALVES, Juliane. **PCR multiplex para detecção de *Campylobacter* spp. e *Salmonella* spp. em carne de frango.** 2010. 61 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2010.

## RESUMO

O Brasil é o terceiro produtor e o primeiro exportador mundial de carne de frango, sendo o Estado do Paraná o segundo maior produtor brasileiro. *Salmonella* spp e *Campylobacter* spp são as causas mais frequentes de doenças bacterianas transmitidas por alimentos no mundo e os produtos avícolas apontados como os principais veículos de transmissão para o ser humano. O monitoramento dessas bactérias em carne de frango, é fundamental para evitar que barreiras sanitárias possam interferir na comercialização, como também, é essencial para o controle da doença humana. Os métodos convencionais de isolamento de *Campylobacter* e *Salmonella* em alimentos podem requerer de quatro a dez dias para a conclusão dos resultados. Métodos moleculares, como a PCR, têm sido otimizados para detecção, identificação e quantificação dessas bactérias em alimentos, devido à rapidez, especificidade e sensibilidade. Embora vários kits comerciais estejam disponíveis, o seu alto custo dificulta o uso nos laboratórios de diagnóstico e controle de qualidade, principalmente em países em desenvolvimento como o Brasil. A padronização de um ensaio molecular específico e, principalmente, a detecção simultânea dessas duas bactérias patogênicas vem de encontro à necessidade desses laboratórios. O objetivo desse trabalho foi otimizar um ensaio de PCR multiplex (mPCR) para a detecção simultânea de *Salmonella* spp. e *Campylobacter* spp. em carne de frango. A mPCR otimizada utilizou o par de iniciadores Styinva-JHO-Right e Styinva-JHO-Left, específico para *Salmonella* spp., que gerou um amplicon de 119 pares de bases. O par de iniciadores específico para *Campylobacter* spp. foi OT1559 e 18-1 gerando um amplicon de 287 pares de bases. A especificidade do ensaio mPCR otimizado foi de 100%, testada com culturas puras de diferentes sorovares de *Salmonella*, *C. jejuni*, *C. coli* e outras espécies bacterianas. A reação de mPCR otimizada detectou  $10^2$  UFC/mL de *Campylobacter* spp. e  $10^0$  UFC/mL de *Salmonella* spp., após 24 horas de enriquecimento. Das 50 amostras de carne de frango analisadas, adquiridas no comércio de Londrina, duas (4%) estavam contaminadas com *Salmonella* spp. e 28 (56%) com *Campylobacter* spp. A presença dessas bactérias foi confirmada pelo método tradicional de cultura. A mPCR padronizada neste trabalho é uma alternativa rápida, barata e eficiente para detecção simultânea de *Salmonella* spp. e *Campylobacter* spp. em carne de frango, após 24 horas de enriquecimento.

**Palavras-chave:** PCR multiplex. Detecção. carne de frango crua. solução de lise TZ.

ALVES, Juliane. **Multiplex PCR for detection of *Campylobacter* spp. and *Salmonella* spp. in chicken meat.** 2010. 61 f. Dissertation (Master's Degree in Food Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2010.

### ABSTRACT

Brazil is the world's third largest producer and leading exporter of chicken meat, and the State of Paraná is the second largest Brazilian producer. *Salmonella* spp. and *Campylobacter* spp. are the most frequent causes of food-borne diseases worldwide. The control of these bacteria in chicken meat is essential to prevent sanitary barriers and it is essential for the control of human disease. Conventional detection methods of *Campylobacter* and *Salmonella* in food demand four to ten days. Molecular methods such as polymerase chain reaction (PCR) have been developed for detection, identification and quantification of those bacteria in foods due to their rapidity, specificity and sensitivity. Although there are several commercial available kits, their high cost makes routine use in quality control and diagnostic laboratories difficult, especially in developing countries such as Brazil. The development of a specific molecular assay and especially the simultaneous detection of both pathogenic bacteria would be essential for these laboratories. The aim of this study was to develop a multiplex PCR assay (mPCR) for simultaneous detection of *Salmonella* spp. and *Campylobacter* spp. in raw chicken meat. The mPCR was developed using the primers Styinva-JHO-Right and Styinva-JHO-Left specific for *Salmonella* spp. that amplified a 119 bp fragment. The primers specific for *Campylobacter* spp was OT1559 and 18-1 which amplified DNA fragments of 287 bp. The assay specificity was 100% after test with different *Salmonella* serovars, *Campylobacter jejuni*, *C. coli* and other bacterial species in pure cultures. The mPCR detected  $10^2$  CFU/mL of *Campylobacter* spp. and  $10^0$  CFU/mL of *Salmonella* spp. after 24 hours of enrichment. A total of 50 raw chicken meat samples were analyzed and two (4%) were contaminated with *Salmonella* spp. and 28 (56%) with *Campylobacter* spp. The results of mPCR were confirmed by conventional culture method. The developed mPCR is a rapid, inexpensive and efficient alternative for the simultaneous detection of *Samonella* e *Campylobacter* in chicken meat after 24 h enrichment.

**Keywords:** Multiplex PCR. Detection. Raw chicken. TZ lysis solution.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Eletroforese em gel de agarose dos produtos de amplificação utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores específicos para detecção de *Campylobacter* spp. e *Salmonella* spp. M) marcador de massa molecular 100 pb (Invitrogen); 1) representativo de controle negativo; 2) produto da mPCR 3) produto da mPCR utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores OT1559 e 18-1, específicos para o detecção do gênero *Campylobacter*; 4) produtos da mPCR utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores Styinva-JHO-2-left e Styinva-JHO-2-right, específicos para detecção do gênero *Salmonella*. Gel de agarose 1,5% corado com 0,02 µL/mL de SYBR® Safe 10,000X em DMSO (Invitrogen). .....42
- Figura 2** – Sensibilidade da mPCR para detecção de *Campylobacter* spp. e *Salmonella* spp. M) Marcador de massa molecular 100 pb (Invitrogen); 1) representativo de controle negativo; 2) produtos da mPCR 3) produto da mPCR utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores OT1559 e 18-1, específicos para o detecção do gênero *Campylobacter*; 4) produto da mPCR utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores Styinva-JHO-2-left e Styinva-JHO-2-right, específicos para detecção do gênero *Salmonella*. 5 - 10) mPCR de DNA extraído de suspensão bacteriana contendo entre 107 a 102 UFC/mL de *C. jejuni* ATCC 33291 e *S. Enteritidis* respectivamente. Gel de agarose 1,5% corado com 0,02 µL/mL de SYBR® Safe 10,000X em DMSO (Invitrogen). .....44
- Figura 3** – Sensibilidade da mPCR para detecção de *Campylobacter* spp. após 24h de enriquecimento seletivo. M) Marcador de massa molecular 100 pb (Invitrogen); 1) representativo de controle negativo; 2-7) mPCR de DNA extraído de suspensão bacteriana contendo entre 107 a 102 UFC/mL de *C. jejuni* ATCC 33291. Gel

de agarose 1,5% corado com 0,02 µL/mL de SYBR® Safe 10,000X em DMSO (Invitrogen). .....45

**Figura 4 –** Sensibilidade da mPCR para detecção de *Salmonella* spp. após 24h de enriquecimento não seletivo. M) Marcador de massa molecular 100 pb (Invitrogen); 1) representativo de controle negativo; 2) produtos da mPCR; 3) produto da mPCR utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores OT1559 e 18-1, específicos para o detecção do gênero *Campylobacter*; 4) produto da mPCR utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores Styinva-JHO-2-left e Styinva-JHO-2-right, específicos para detecção do gênero *Salmonella*.; 5-12) mPCR de DNA extraído de suspensão bacteriana contendo entre contendo 107 a 100 UFC/mL de *S. Enteritidis*. Gel de agarose 1,5% corado com 0,02 µL/mL de SYBR® Safe 10,000X em DMSO (Invitrogen). .....45

**Figura 5 –** Análise de amostras de carne de frango através de mPCR para detecção de *Campylobacter* spp. e *Salmonella* spp. M) Marcador de massa molecular 100 pb (Invitrogen); 1,3 e 4) Amostra naturalmente contaminada com *Campylobacter* spp. 2) amostra negativa para *Campylobacter* spp. e *Salmonella* spp. 5 e 6) Amostras naturalmente contaminadas com *Campylobacter* spp. e *Salmonella* spp. Gel de agarose 1,5% corado com 0,02 µL/mL de SYBR® Safe 10,000x em DMSO, (Invitrogen). .....47

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Nomenclatura do gênero <i>Salmonella</i> .....	23
<b>Tabela 2</b> – Genes alvos testados anteriormente para detecção de <i>Salmonella</i> spp.....	29
<b>Tabela 3</b> – Genes alvos testados para detecção de <i>Campylobacter</i> spp. ....	31
<b>Tabela 4</b> – Cepas bacterianas utilizadas neste estudo.....	34
<b>Tabela 5</b> – Características dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados na reação de mPCR para detecção de <i>Salmonella</i> spp. e <i>Campylobacter</i> spp. amplicon. ....	36

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>%</b>	Porcentagem
<b>&lt;</b>	Menor
<b>°C</b>	grau Celsius
<b>ATCC</b>	<i>American Type Culture Collection</i>
<b>BHI</b>	caldo infusão de cérebro e coração
<b>CCAMP</b>	Sub-coleção de <i>Campylobacter</i>
<b>CCBS</b>	Coleção de Culturas de Bactérias de Interesse em Saúde
<b>CDC</b>	<i>Center for Disease Control and Prevention</i>
<b>CDT</b>	toxina distensora citoletal
<b>cm</b>	Centímetro
<b>CO<sub>2</sub></b>	dióxido de carbono
<b>DIPOA</b>	Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DNA</b>	ácido desoxirribonucleico
<b>dNTPs</b>	dinucleosídeos trifosfatados
<b>EDTA</b>	ácido etilenodiamino tetra-acético
<b>FIOCRUZ</b>	Fundação Oswaldo Cruz
<b>g</b>	Gramma
<b>g</b>	força G
<b>h</b>	Horas
<b>hab.</b>	Habitantes
<b>HCl</b>	ácido clorídrico
<b>IHF</b>	fator de integração do hospedeiro
<b>KCl</b>	cloreto de potássio
<b>kg</b>	Quilogramas
<b>LACEN</b>	Laboratório Central do Estado
<b>M</b>	Molar
<b>MAPA</b>	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
<b>mg</b>	Miligrama
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	cloreto de magnésio
<b>min</b>	minutos

<b>mL</b>	mililitro
<b>mM</b>	milimolar
<b>mol</b>	massa molar
<b>mPCR</b>	PCR multiplex
<b>N<sub>2</sub></b>	nitrogênio
<b>O<sub>2</sub></b>	oxigênio
<b>pb</b>	pares de base
<b>PCR</b>	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em cadeia da polimerase)
<b>pH</b>	potencial hidrogeniônico
<b>PR</b>	Estado do Paraná
<b>RJ</b>	Estado do Rio de Janeiro
<b>RNAr</b>	ácido ribonucleico ribossomal
<b>RV</b>	Rappaport-Vassiliadis
<b>s</b>	segundos
<b>SIF</b>	Serviço de Inspeção Federal
<b>SPI-1</b>	Ilha de patogenicidade 1 de <i>Salmonella</i>
<b>SPI-2</b>	Ilha de patogenicidade 2 de <i>Salmonella</i>
<b>Tris</b>	Tris (hidroximetil)-aminometano
<b>TT</b>	Tetracionato
<b>U</b>	unidade
<b>UEL</b>	Universidade Estadual de Londrina
<b>UFC</b>	unidades formadoras de colônias
<b>UFC/g</b>	unidades formadoras de colônias por grama
<b>UFC/mL</b>	unidades formadoras de colônias por mililitro
<b>UV</b>	ultravioleta
<b>V</b>	volt
<b>WHO</b>	World Health Organization
<b>XLD</b>	Xilose Lisina Desoxicolato de Sódio
<b>µg</b>	micrograma
<b>µL</b>	microlitro
<b>µL/mL</b>	microlitro por mililitro
<b>µM</b>	micromolar

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>17</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVO GERAL</b>	<b>19</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	<b>20</b>
<b>4</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>21</b>
4.1	EPIDEMIOLOGIA DA CAMPILOBACTERIOSE	21
4.2	EPIDEMIOLOGIA DA SALMONELOSE	22
4.3	TÉCNICAS DE PCR E MPCR	25
4.4	MPCR PARA DETECÇÃO DE <i>CAMPYLOBACTER</i> SPP. E <i>SALMONELLA</i> SPP.	26
4.5	GENE <i>INV</i> A E PAR DE OLIGONUCLEOTÍDEO INICIADOR ESPECÍFICO PARA DETECÇÃO DE <i>SALMONELLA</i> SPP.	28
4.6	GENES E PAR DE OLIGONUCLEOTÍDEO INICIADOR ESPECÍFICO PARA DETECÇÃO DE <i>CAMPYLOBACTER</i> SPP.	30
<b>5</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>33</b>
5.1	CEPAS BACTERIANAS	33
5.2	REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE – PCR	35
5.2.1	Extração de DNA dos Isolados Bacterianos Utilizados como Controle Positivo	35
5.2.2	Otimização da mPCR	35
5.2.3	Análise dos Produtos de Amplificação	37
5.2.4	Avaliação da Especificidade do Ensaio PCR Otimizado	37
5.2.5	Avaliação da Sensibilidade do Ensaio PCR Otimizado	37
5.3	ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DO ENXÁGUE DE CARNE DE FRANGO ARTIFICIALMENTE E NATURALMENTE CONTAMINADO	38
5.3.1	Enxágue da Pele de Frango e Contaminação Artificial com <i>S. Enteritidis</i> e <i>C. jejuni</i> ATCC 33291	38
5.3.2	Análise Microbiológica da Carne de Frango Naturalmente Contaminada	39
5.3.3	Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp	39

5.3.4	Pesquisa de <i>Campylobacter</i> spp. ....	40
5.4	AVALIAÇÃO DA mPCR EM AMOSTRAS DE CARNE DE FRANGO ARTIFICIALMENTE E NATURALMENTE CONTAMINADAS .....	40
5.4.1	Extração do DNA .....	40
5.4.2	Avaliação da mPCR Padronizada .....	40
<b>6</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>41</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>49</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>50</b>
	<b>ANEXO</b> .....	<b>60</b>
	ANEXO A – FLUXOGRAMA DE ANÁLISE DE AMOSTRAS DE CARNE DE FRANGO .....	61

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o terceiro produtor mundial de carne de frango e o primeiro exportador desse produto. O Estado de Santa Catarina é o maior produtor brasileiro de carne de frango, seguido do Paraná e Rio Grande do Sul. Em 2009, foram produzidas aproximadamente 10,9 milhões de toneladas de carne de frango e cerca de 33,2% deste total foi destinado a exportação. O consumo *per capita* brasileiro, passou de 26,3 kg de frango, em 1998, para 38,9 kg, em 2008 (UBA, 2009).

Doenças de origem alimentar continuam sendo um grande problema de saúde pública. *Salmonella* spp. e *Campylobacter* spp. são as causas mais frequentes de doença bacteriana de origem alimentar e os produtos avícolas apontados como os principais veículos de transmissão para o ser humano. As barreiras sanitárias na exportação, principalmente de carne de frango, tem exigido o controle da contaminação do plantel de aves por essas bactérias patogênicas (ELLINGSON *et al.*, 2004; WHO, 2009).

Os principais sintomas de salmonelose incluem náusea, vômito acompanhado de dor abdominal, diarreia e algumas vezes febre. Em 1 a 5% dos casos, a salmonelose pode causar doença sistêmica, a qual se não tratada pode ser fatal (MALORNY *et al.*, 2009). Nos Estados Unidos, aproximadamente 40.000 casos de salmonelose são notificados a cada ano, com um número estimado de aproximadamente 400 óbitos (CDC, 2009b).

*Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* são as espécies mais comuns que infectam humanos. Os sintomas mais comuns de campilobacteriose incluem náusea, cólicas abdominais e diarreia sanguinolenta. A maioria dos casos é branda e autolimitada. Entretanto, complicações pós infecção podem ocorrer, tais como, artrite, síndrome de Reiter e Síndrome de Guillain-Barré, uma doença auto-imune que ataca o sistema nervoso periférico sendo esta considerada uma seqüela da infecção causada especificamente por *C. jejuni* (LINTON *et al.*, 1996; BLASER, 1997; YAN *et al.*, 2005; SIMMONS *et al.*, 2008). Segundo o CDC, a maioria dos casos de campilobacteriose ocorre esporadicamente e não como parte de surtos. Nos Estados Unidos, é estimado que ocorram aproximadamente 2,4 milhões de casos a cada ano, com uma média 124 óbitos (CDC, 2009a). No Brasil, os casos de

campilobacteriose são subdiagnosticados e subnotificados e não há acesso a dados epidemiológicos.

No Estado do Paraná, entre os anos de 1999 e 2008, 286 surtos de salmonelose foram notificados no Laboratório Central do Estado (LACEN), Curitiba, PR. Neste período 5.641 pessoas foram expostas a alimentos contaminados com *Salmonella* spp. sendo que 2.027 (35,9% manifestaram os sintomas da doença e 881 (16,3%) foram hospitalizadas. Um óbito foi registrado em abril de 2000 devido a ingestão de bolo contaminado por *S. Enteritidis* (KOTTWITZ *et al.*, 2010).

Os métodos convencionais de isolamento de *Campylobacter* spp. e *Salmonella* spp. em alimentos são demorados e podem requerer de quatro a dez dias para a conclusão dos resultados. Esses métodos utilizam meios de enriquecimento seletivo com posterior subcultivo em meios sólidos seletivos. Após isolamento, a identificação fenotípica requer testes bioquímicos e sorológicos adicionais (CANDRIAN, 1995; OMICCIOLI *et al.*, 2009).

Devido à rapidez, especificidade e sensibilidade, métodos moleculares, como a PCR, têm sido otimizados para detecção, identificação e quantificação específica e individual de *Campylobacter* spp. e *Salmonella* spp. em alimentos (OLIVEIRA *et al.*, 2005; AMRI *et al.*, 2007; DEBRETSON *et al.*, 2007; KATZAV *et al.*, 2008; O'REGAN *et al.*, 2008; GÓMEZ-DUARTE *et al.*, 2009; KANKI *et al.*, 2009; MALORNY *et al.*, 2009; OMICCIOLI *et al.*, 2009; PEPE *et al.*, 2009; CASARIL, 2010; FREITAS *et al.*, 2010; PUI *et al.*, 2010). Por outro lado, poucos trabalhos foram realizados para a detecção simultânea dessas duas bactérias. É importante ressaltar que os *kits* comerciais disponíveis para detecção de *Campylobacter* spp. ou *Salmonella* spp. são importados e o custo elevado dificulta o uso nos laboratórios de diagnóstico e controle de qualidade. A padronização de um ensaio molecular específico, e, principalmente, a detecção simultânea dessas duas bactérias patogênicas vem de encontro à necessidade desses laboratórios.

Dado o exposto, o objetivo deste trabalho foi otimizar um ensaio PCR multiplex (mPCR) para detecção simultânea de *Campylobacter* spp. e *Salmonella* spp. em carne de frango.

## 2 OBJETIVO GERAL

Otimizar um ensaio de mPCR para detecção simultânea de *Salmonella* spp. e *Campylobacter* spp. em carne de frango.

### 3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Definir os pares de iniciadores e as melhores condições de amplificação de DNA a serem utilizadas na mPCR para detecção de *Salmonella* spp. e *Campylobacter* spp. em culturas puras.

Testar em amostras de carne de frango artificialmente e naturalmente contaminadas com *Salmonella* spp. e *Campylobacter* spp. o ensaio mPCR otimizado.

## 4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 4.1 EPIDEMIOLOGIA DA CAMPILOBACTERIOSE

O gênero *Campylobacter* é constituído por 18 espécies de bacilos Gram-negativos, curvos ou espiralados podendo adquirir morfologia cocóide, correspondente às formas não cultiváveis. Apresentam um único flagelo polar duas a três vezes maior que o tamanho da célula, responsável pelo movimento em saca-rolha (FRANCO; LANDGRAF, 2002).

As espécies de *Campylobacter* são microaerófilas, multiplicam-se em atmosfera contendo aproximadamente 10% CO<sub>2</sub> e 5% O<sub>2</sub>. As espécies patogênicas ao homem multiplicam-se em uma faixa de temperatura máxima de 46°C e mínima de 30°C, sendo classificadas como termofílicas (HUMPHREY *et al.*, 2007).

*C. jejuni* e *C. coli* são responsáveis por 95% dos casos de campilobacteriose em humanos. Essas bactérias são comensais do trato gastrointestinal de uma série de animais domésticos e silvestres (bois, porcos, gatos, cães, roedores e aves). As aves, especialmente o frango, são consideradas reservatórios primários de *C. jejuni* (FORSYTHE, 2002; PARK, 2002). Nas aves a colonização é geralmente assintomática, podendo ser encontrados níveis de até 10<sup>9</sup> UFC/g de fezes sem sintomas clínicos da doença. O intestino das aves tem uma temperatura superior à dos mamíferos, cerca de 42°C, podendo ser essa a causa da alta incidência de *C. jejuni* em frangos (PARK, 2002).

A contaminação ambiental é apontada como a rota mais comum de transmissão de *Campylobacter spp.* As fontes potenciais de contaminação das aves são os roedores, aves silvestres e insetos que tenham acesso à granja. A utilização de água não tratada também é um veículo de contaminação (MEAD, 2004).

Os sintomas mais comuns de campilobacteriose incluem náusea, cólicas abdominais e diarreia sanguinolenta. A maioria dos casos é branda e autolimitada. Complicações pós infecção podem ocorrer, tais como, artrite, síndrome de Reiter e Síndrome de Guillain-Barré, uma doença auto-imune que ataca o sistema nervoso periférico, sendo esta considerada uma sequela da infecção

causada especificamente por *C. jejuni* (LINTON *et al.*, 1996; BLASER, 1997; YAN *et al.*, 2005; SIMMONS *et al.*, 2008).

Nos Estados Unidos, é estimado que ocorram anualmente aproximadamente 2,4 milhões de casos de campilobacteriose. Apesar dessa infecção não ser uma causa comum de óbito, em média 124 pessoas morrem a cada ano (CDC, 2009a).

Segundo o CDC, a maioria dos casos de campilobacteriose ocorre esporadicamente e não como parte de surtos. A estimativa é que *Campylobacter* seja responsável por 5% a 14% dos casos de diarreia em humanos no mundo, e que, um a cada 1000 casos evoluam para Síndrome de Guillain Barré (HUMPHREY *et al.*, 2007; OLSEN *et al.*, 2009a). No Brasil, os casos de campilobacteriose são subdiagnosticados e subnotificados e não há fácil acesso a dados epidemiológicos.

A prevalência de *C. jejuni* e *C. coli* e sua relação com o estado nutricional de crianças com idade de dois a 36 meses do Nordeste Brasileiro foi determinada em um estudo realizado entre março e julho de 2007. Embora a prevalência de *C. jejuni* e *C. coli* tenha sido similar no grupo diarréico e não diarréico, houve uma associação significativa entre a infecção por *C. jejuni* e baixo estado nutricional das crianças (QUETZ *et al.*, 2010).

#### 4.2 EPIDEMIOLOGIA DA SALMONELOSE

*Salmonella* spp. pertence à família Enterobacteriaceae e compreende um grande número de patógenos clinicamente importantes (SU; CHIU, 2007). Com base nos antígenos O (polissacarídeo de superfície) e H (flagelar), *Salmonella enterica* é classificada em mais de 2500 sorovares e aproximadamente 60% destes foram identificados a partir de isolados da subespécie *enterica* (I) (GRIMONT; WEILL, 2007; ARRACH *et al.*, 2008). As formas antigênicas dos sorovares de *Salmonella* são definidas e mantidas pelo “World Health Organization (WHO) Collaborating Center for Reference and Research on *Salmonella*” (WHO Collaborating Center) no Instituto Pasteur, Paris, França, e novos sorovares são apresentados em atualizações anuais do Esquema Kauffmann-White (BRENNER *et al.*, 2000). O gênero *Salmonella* consiste em duas espécies, *S. bongori* e *S. enterica*,

a qual é dividida em seis subespécies: *S. enterica* subesp. *enterica* (I), *S. enterica* subesp. *salamae* (II), *S. enterica* subesp. *arizonae* (IIIa), *S. enterica* subesp. *diarizonae* (IIIb), *S. entérica* subesp. *houtenae* (IV), e *S. enterica* subesp. *indica* (VI) (BRENNER *et al.*, 2000; POPOFF *et al.*, 2004; SU; CHIU, 2007; ARRACH *et al.*, 2008). Uma terceira espécie, *S. subterranea*, foi identificada no ano de 2004, porém até o momento a sua inclusão como espécie de *Salmonella* não foi aceita por todos os órgãos internacionais (SHELOBOLINA *et al.*, 2004; SU; CHIU, 2007) tabela 1.

**Tabela 1** – Nomenclatura do gênero *Salmonella*

<b>Espécies</b>	<b>Subespécies</b>	<b>Número de sorovares</b>
<i>S. entérica</i>	<i>enterica</i> (I)	1531
	<i>salamae</i> (II)	505
	<i>arizonae</i> (IIIa)	99
	<i>diarizonae</i> (IIIb)	336
	<i>houtenae</i> (IV)	73
	<i>indica</i> (VI)	13
<i>S. bongori</i>	(V)	22
<i>S. subterranea</i>		
<b>Total</b>		<b>2579</b>

**Fonte:** Adaptado de Grimont e Weill (2007) e Su e Chiu (2007)

A contaminação de alimentos por *Salmonella* continua sendo a maior causa de salmonelose e os sorovares Enteritidis e Typhimurium os responsáveis pela maioria das infecções. Em vários países, os casos esporádicos e de surtos de salmonelose humana têm sido comumente associados a alimentos de origem animal, tais como, ovos, carne bovina, suína, de aves, e seus derivados e produtos de laticínios. Nos países em desenvolvimento, a contaminação fecal de água é a causa de infecção em humanos pelos sorovares Typhi e Paratyphi (ALCOCER *et al.*, 2006; DUNKLEY *et al.*, 2009; MALORNY *et al.*, 2009).

As infecções por *Salmonella* em aves apresentam quadros clínicos graves, como a pulorose (*S. Pullorum*) e o tifo aviário (*S. Gallinarum*), que implicam na maioria das vezes na eliminação dos lotes infectados. O grande enigma desta zoonose reside nas formas clínicas inaparentes, denominadas na patologia aviária

como infecções paratíficas. Essas infecções são responsáveis por uma queda da produtividade do plantel quando aparentes e propagam-se silenciosamente através da contaminação do ambiente (HOFER *et al.*, 1997; CALIXTO *et al.*, 2002).

Frangos podem ser reservatórios de *Salmonella* spp. e grande parte dos surtos em humanos têm sido associados a produtos de origem avícola (OLAH *et al.*, 2005). Carne de frango e ovos são importantes veículos de transmissão de *Salmonella* spp., porém, um aumento na incidência de *Salmonella* spp. em frutas e vegetais frescos tem sido observado nos Estados Unidos. Esse aumento está relacionado a práticas agrícolas como irrigação com água contaminada e uso de adubo orgânico (ESPINOZA-MEDINA *et al.*, 2006; LEE *et al.*, 2006).

Salmonelose em humanos pode causar gastroenterite autolimitada com sintomas brandos a moderados incluindo náusea, vômito, febre, dor abdominal e diarreia. Sintomas clínicos mais severos, podem ocorrer em casos de bacteremia ou febre entérica (tifóide), o qual é caracterizado por cefaléia severa, febre alta, porém com ausência de diarreia (LEADER *et al.*, 2009; MALORNY *et al.*, 2009).

Nos Estados Unidos, aproximadamente 40.000 casos de salmonelose são notificados a cada ano. Alguns casos brandos não são diagnosticados e por isso, o número de infecções por *Salmonella* pode ser trinta vezes maior que o notificado. É estimado que aproximadamente 400 pessoas morram a cada ano devido a salmonelose aguda (CDC, 2009b).

No Estado do Paraná, no período de janeiro de 1999 a dezembro de 2008, 52 municípios (13,0%) dos 399, que compõe o Estado do Paraná, notificaram surtos de salmonelose. Curitiba, município de maior população no Estado (1.797.408 habitantes), apresentou a maior incidência com 90 surtos (31,5%), seguida de Francisco Beltrão (72.409 hab.) com 17 surtos (6,0%) e Cascavel (285.784 hab.) com 15 (5,2%). Londrina notificou quatro surtos. Nesse período, 5.641 pessoas foram expostas a alimentos contaminados com *Salmonella* spp, 2.027 (35,9%) manifestaram os sintomas da doença e 881 (16,3%) foram hospitalizadas. Dos pacientes hospitalizados, um óbito foi registrado em abril de 2000, em Nova Cantu, provocado pela ingestão de bolo contaminado por *S. Enteritidis*. Dos alimentos associados aos surtos, 45,0% (84) eram à base de ovos, 34,8% carnes e derivados (65) e 20,2% classificados como alimentos variados, tais como queijos (1,0%), saladas (de tomate, repolho, couve, milho e ervilha) (4,8%), arroz cozido, extrato de

tomate, fritas, mandioca, mousse, pudim, sorvetes, farofa, pavê e massas prontas (14,4%)(KOTTWITZ *et al.*, 2010).

#### 4.3 TÉCNICAS DE PCR E MPCR

A técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) foi criada em meados dos anos 1980 por Kary Mullis e constitui um procedimento cíclico *in vitro* com três passos: desnaturação do alvo, hibrida o dos iniciadores e polimeriza o da sequência alvo. Esses passos se repetem de 30 a 40 vezes, gerando  $2^n$  cópias da região de interesse do DNA, onde  $n$    igual ao número de ciclos da rea o.

A PCR   baseada na habilidade da enzima DNA polimerase de replicar uma sequência alvo de DNA específica e na análise do produto de amplifica o (MULLIS; FALOONA, 1987). Quando dois oligonucleotídeos iniciadores complementares em rela o às extremidades da sequência que se deseja amplificar se hibridam-se a uma das fitas do DNA, esta sequência   amplificada exponencialmente a cada ciclo. A escolha da sequência dos oligonucleotídeos iniciadores determina a especificidade e, conseqüentemente, o sucesso da PCR. Os produtos da PCR são submetidos a eletroforese em gel de agarose para separa o desses produtos de amplifica o, de acordo com sua massa molecular, os quais, são então visualizados sob luz UV, após colora o com corantes intercalantes de DNA, tais como, brometo de etídio ou SYBR  safe (MALORNY *et al.*, 2009). A PCR   uma técnica que requer menos tempo e menos trabalho que os métodos baseados em culturas convencionais de detec o de patógenos em amostras de alimentos.

A mPCR foi descrita pela primeira vez em 1988 por Chamberlain *et al.* Essa técnica   uma varia o da PCR e consiste na amplifica o de várias sequências alvo, simultaneamente, devido ao uso de dois ou mais pares de oligonucleotídeos iniciadores em uma mesma rea o. A mPCR reduz os gastos com reagentes, pois permite a detec o simultânea de diversos patógenos em uma única rea o de amplifica o (PERRY *et al.*, 2007).

#### 4.4 MPCR PARA DETECÇÃO DE *CAMPYLOBACTER* SPP. E *SALMONELLA* SPP.

Os métodos convencionais de detecção de *Salmonella* spp. e *Campylobacter* spp. em alimentos são laboriosos e requerem até sete dias para a conclusão dos resultados.

Apesar da disponibilidade de *kits* comerciais para detecção de patógenos em alimentos por técnica molecular, tais como, TaqMan® *Food Pathogen Detection Kits* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), Roche *Diagnostics* (Mannheim, Germany), iQ-Check PCR *test kit* (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) e o sistema automatizado BAX® *system Q7* (Du Pont Qualicon, Wilmington, DE, USA), é desejável para os laboratórios de referência a padronização de ensaios não comerciais, os quais, possuem menor custo, além de informações sobre quais os genes que estão sendo amplificados e as concentrações de reagentes utilizados (SCHODER *et al.*, 2003).

O método de diagnóstico convencional de *Campylobacter* requer enriquecimento em caldo seletivo a 42°C sob condições de microaerofilia e posterior cultura em ágar seletivo sob as mesmas condições. Culturas com colônias morfológicamente características e oxidase positiva são consideradas *Campylobacter* spp. A identificação da espécie requer outros testes, incluindo crescimento em diferentes temperaturas, sensibilidade aos antibióticos cefalotina e ácido nalidíxico e testes bioquímicos. Esses métodos requerem quatro dias para a conclusão de um resultado negativo, e seis a sete dias para confirmar um resultado positivo (OLIVEIRA *et al.*, 2005; AMRI *et al.*, 2007).

Métodos de identificação fenotípica de *Campylobacter* spp. são limitados devido a existência de isolados bioquimicamente atípicos como também, pelo seu crescimento fastidioso e assacarolítico, o qual restringe o número de testes bioquímicos diferenciais. Além disso, os métodos convencionais de identificação apresentam interpretações subjetivas dos resultados (LINTON *et al.*, 1996; LOGAN *et al.*, 2001). Além de demorados e caros, esses métodos são poucos sensíveis e não confiáveis para a detecção de pequenos números de células. Não detectam células viáveis e não cultiváveis e podem apresentar dificuldade na diferenciação das espécies devido a possibilidade de não expressão das características

fenotípicas (JACKSON *et al.*, 1996; WOLFFS *et al.*, 2005; DEBRETSION *et al.*, 2007).

As técnicas microbiológicas tradicionais para detecção de *Salmonella* spp. em alimentos levam até cinco dias para obtenção de um resultado positivo pois incluem: pré-enriquecimento em meio líquido não seletivo, enriquecimento em meio líquido seletivo, plaqueamento em ágar seletivo diferencial, identificação e confirmação por testes bioquímicos e sorológicos das colônias características. Além disso, a sorotipagem para determinação do sorovar é feita em laboratórios de referência. A sorotipagem é baseada na variabilidade antigênica do lipolissacarídeo (antígeno O), das proteínas flagelares (antígeno H1 e H2) e do polissacarídeo capsular (antígeno Vi) quando presente (HEIN *et al.*, 2006; MALORNY *et al.*, 2009).

A detecção rápida de *Salmonella* spp. e *Campylobacter* spp. em alimentos principalmente de produtos avícolas, facilitaria a identificação das fontes de contaminação e auxiliaria a implementação efetiva de medidas de intervenção. A técnica de mPCR tem sido amplamente utilizada para detecção dessas bactérias em diferentes matrizes alimentares. PCR multiplex foi utilizada para detecção de *Salmonella* em amostras de solo e água (WAY *et al.*, 1993), fezes (CHIU; OU, 1996; ALVAREZ *et al.*, 2004), mexilhões (VANTARAKIS *et al.*, 2000), ambiente de aviário e abatedouro (SOUMET *et al.*, 1999; CORTEZ *et al.*, 2006), pernil cozido (JOFRE' *et al.*, 2005), e carcaça e pele de frango (MAHON *et al.*, 1994; SILVA, 2008; FREITAS *et al.*, 2010). mPCR também foi padronizada para diferenciação de espécies de *Campylobacter* em etapas do abate de suínos (CLOAK; FRATAMICO, 2002), carne de frango (CASARIL, 2010), como também, de amostras de fezes humanas e de frango (AMRI *et al.*, 2007).

Poucos ensaios de mPCR para detecção simultânea de *Salmonella* spp. e *Campylobacter* spp. foram otimizados. Vollenhofer-Schrumpf *et al.* (2005) testaram mPCR, seguida de técnica de hibridação, para detecção de *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes* e *Campylobacter* spp. em amostras de frango. Ensaio mPCR foi otimizado para detecção simultânea em fezes humanas de *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio cholerae*, e *Campylobacter* spp. (GÓMEZ-DUARTE *et al.*, 2009). Wolffs *et al.* (2007) relataram a quantificação simultânea de *Campylobacter* spp. e *Salmonella*

spp. em água de lavagem de frango utilizando a técnica de flotação seguida por mPCR em tempo real.

Até o momento, não foi encontrado na literatura a padronização de mPCR para detecção específica e simultânea de *Campylobacter* spp. e *Salmonella* spp. em carne de frango.

#### 4.5 Gene *invA* e Par de Oligonucleotídeo Iniciador Específico para Detecção de *Salmonella* spp.

A maioria dos ensaios de PCR tradicional e em tempo real usa parte do gene *invA* como sequência alvo (MALORNY *et al.*, 2009). A sequência desse gene cromossomal é única para *Salmonella*, e está amplamente distribuída, possivelmente, entre todos os sorovares de *Salmonella* (OLAH *et al.*, 2005) podendo ser utilizada como um marcador genético para o gênero.

Malorny *et al.* (2009) mostraram que um número pequeno de outros genes (tabela 2) foram utilizados para detecção de *Salmonella* spp., entre eles, a junção entre *sipB–sipC*, *sipC*, *spaO*, *fimC*, junção entre *invA–invE*, *himA* e *ttrA–ttrC*. com exceção de *ttrA–ttrC*, *fimC* e *himA* os demais genes estão localizados na Ilha de patogenicidade 1 de *Salmonella* (SPI-1), que codifica o sistema de secreção tipo III, o qual exporta proteínas de membrana interna e externa em resposta a um contato bacteriano com células epiteliais (SALOMONSSON *et al.*, 2005). Essa região tem um papel importante na patogenicidade da *Salmonella* e é altamente conservada nas espécies *S. enterica* e *S. bongori*. O locus *ttr*, o qual está localizado na SPI-2 também é altamente conservado nessas espécies de *Salmonella*. O locus *ttr* é necessário para respiração da *Salmonella* na presença de tetracionato. Esse locus consiste em cinco genes organizados como operon. Os genes *ttrA*, *ttrB* e *ttrC* codificam as proteínas estruturais da tetracionato redutase e os genes *ttrS* e *ttrR* codificam TtrS e TtrR, que correspondem ao sensor e os componentes da resposta regulatória de um sistema regulador de dois componentes, o qual é necessário para a transcrição do operon *ttrBCA* (HENSEL *et al.*, 1999). O operon *fim* consiste em nove genes *fim* os quais codificam o pili tipo 1. O gene *himA* codifica a proteína IHF-alpha, capaz de se ligar ao DNA.

**Tabela 2** – Genes alvos testados anteriormente para detecção de *Salmonella* spp.

Gene	Características	Referência
<i>invA</i>	Localizados na Ilha de	Hoorfar <i>et al.</i> (2000)
<i>invA–invE</i>	patogenicidade 1 de	Kurowski <i>et al.</i> (2002)
<i>sipB–sipC</i>	<i>Salmonella</i> (SPI-1)	Ellingson <i>et al.</i> (2004)
<i>sipC</i>	codificam o sistema de	Kurowski <i>et al.</i> (2002)
<i>spaO</i>	secreção tipo III	Kurowski <i>et al.</i> (2002)
<i>fimC</i>	Pili tipo 1	Krascenicsová <i>et al.</i> (2008)
<i>ttrA–ttrC</i>	Localizados em SPI-2 codificam proteínas estruturais da tetracionato redutase	Malorny <i>et al.</i> (2004b)
<i>himA</i>	Proteína (IHF-alpha)	Chen <i>et al.</i> (2000)

Fonte: Adaptado de Malorny *et al.* (2009)

Uma característica comum de patogenicidade de todas as cepas de *Salmonella* é a sua habilidade de invasão de células do epitélio intestinal. O operon *inv* é composto por genes, os quais permitem que *Salmonella* spp. invada células epiteliais e está presente na maioria, se não em todos os sorovares de *Salmonella*. O gene *invA* é o primeiro gene do operon *inv* que é constituído de outros genes, *invB*, *C*, *D*, que codificam proteínas que participam do processo de invasão (GALÁN *et al.*, 1992).

Rahn *et al.* (1992) publicaram um ensaio de PCR o qual utilizava um par de oligonucleotídeo iniciador complementar ao gene *invA*. Nesse estudo, foram testadas 630 cepas de *Salmonella* e 142 cepas de outras bactérias. Apenas duas cepas de *S. Senftenberg* e duas cepas de *S. Lichtfield* não apresentaram produto de amplificação na reação (RAHN *et al.*, 1992). A região do gene e os oligonucleotídeos iniciadores utilizados, apresentaram grande seletividade em um estudo comparativo (MALORNY *et al.*, 2003), e foram selecionados para participar de um estudo de validação internacional (MALORNY *et al.*, 2004a).

Hoorfar *et al.* (2000) também utilizaram a sequência do gene *invA* para desenhar o par de oligonucleotídeos iniciadores Styinva-JHO-2-left e Styinva-

JHO-2–right, os quais amplificam uma sequência de DNA de 119 pb. Nesse estudo, 110 cepas de *Salmonella* de diferentes sorovares foram avaliadas além de 120 cepas de outras bactérias. Todas as cepas de *Salmonella* foram identificadas pela PCR.

Outros dois estudos utilizaram o mesmo par de oligonucleotídeos iniciadores testados por Hoorfar *et al.* (2000). Rodríguez-Lázaro *et al.* (2003) analisaram por PCR em tempo real 50 cepas de *Salmonella* spp. (incluindo sorovares de *S. enterica* e *S. bongori*) e 30 cepas de outras bactérias. Nesse estudo, a inclusividade (habilidade de detectar o alvo em uma grande gama de cepas) e exclusividade (interferência de um conjunto de cepas não alvo) foi de 100%. Nam *et al.* (2005) utilizaram esse mesmo par de oligonucleotídeos iniciadores para detecção de *Salmonella* spp. em amostras ambientais de uma fazenda produtora de leite. Um total de 124 cepas de *Salmonella* e 116 cepas de outras bactérias foram avaliadas. Todas as cepas de *Salmonella* testadas geraram produtos de amplificação específicos, e as cepas das outras bactérias não geraram produtos de amplificação.

#### 4.6 Genes e Par de Oligonucleotídeo Iniciador Específico para Detecção de *Campylobacter* spp.

Um número pequeno de genes (tabela 3) são utilizados para detecção de *Campylobacter* spp., entre eles, o rRNA 23S e rRNA 16S. Os RNAs ribossomais (rRNA) são moléculas conservadas, distribuídas universalmente e apresentam sequências conservadas ao longo de distâncias filogenéticas. Assim, o grau de similaridade entre sequências de rRNA de dois organismos indica uma relação evolucionária (GUTELL *et al.*, 1994).

O gene *cdt* é um importante fator de virulência para *Campylobacter*. e codifica a CDT. Esta toxina afeta a camada de células epiteliais e causa a distensão progressiva e morte em várias linhagens celulares. A presença do gene *cdt* tem sido sugerida nas espécies, *C. jejuni*, *C. coli* e *C. fetus*, *C. lari* e *C. upsaliensis*. Entretanto, a prevalência desse gene entre os isolados de *Campylobacter* de diferentes reservatórios e potenciais fontes de infecção não foi extensivamente investigada (WISESSOMBAT *et al.*, 2009).

O gene de virulência *cadF* é conservado entre as espécies de *Campylobacter* de diversas origens. Este gene codifica uma proteína de membrana externa a qual promove a ligação da bactéria às células epiteliais do intestino (NAYAK *et al.*, 2005; AMRI *et al.*, 2007).

**Tabela 3** – Genes alvos testados para detecção de *Campylobacter* spp.

Gene	Produto	Espécies alvo	Referência
rRNA 23S	rRNA 23S	<i>C. jejuni</i> , <i>C. coli</i> , <i>C. lari</i>	Eyers <i>et al.</i> (1993)
			Giesendorf <i>et al.</i> (1992)
			Vancamp <i>et al.</i> (1993)
rRNA 16S	rRNA 16S	<i>C. jejuni</i> , <i>C. coli</i> , <i>C. lari</i>	Linton <i>et al.</i> (1996)
			Lübeck <i>et al.</i> (2003)
			Lund <i>et al.</i> (2004)
<i>cdt</i>	Toxina distensora citoletal (CDT)	<i>C. jejuni</i> , <i>C. coli</i> , <i>C. lari</i> e <i>C. upsaliensis</i>	Wisessombat <i>et al.</i> (2009)
<i>cadF</i>	Proteína de membrana externa	<i>Campylobacter</i> spp.	Nayak <i>et al.</i> (2005)

Lübeck *et al.* (2003) utilizaram diferentes combinações de variados pares de oligonucleotídeos iniciadores para desenvolver o melhor ensaio de PCR para detecção de *C. jejuni*, *C. coli* e *C. lari*. Nesse estudo foi mostrado que a combinação mais seletiva de oligonucleotídeos iniciadores era a de OT1559 com 18-1, que amplificaram uma sequência de 287 pb do gene rRNA 16S. O oligonucleotídeo iniciador OT1559 foi utilizado primeiramente como sonda no sistema de amplificação de ácido nucléico NASBA (UYTTENDAELE *et al.*, 1994) para identificação de *C. jejuni*, *C. coli* e *C. lari*, e 18-1 como oligonucleotídeo iniciador para detecção de *Campylobacter* enteropatogênica (VANCAMP *et al.*, 1993). Em um total de 150 cepas foi mostrada uma inclusividade de 100% e

exclusividade de 97%. A especificidade desse par de oligonucleotídeos também foi observada por Perelle *et al.* (2004).

Wolffs *et al.* (2005) utilizaram a técnica de flotação, a qual se baseia na centrifugação de soluções com diferentes densidades, seguida de PCR em tempo real para detecção de *Campylobacter* spp. em amostras de enxágue de frango sem enriquecimento empregando OT1559 e 18-1. A especificidade nesse caso não foi extensivamente testada pois os autores basearam-se na especificidade previamente validada por Lübeck *et al.* (2003). Outro trabalho usando a técnica de flotação foi publicado por Wolffs *et al.* (2007) para detecção simultânea de *Campylobacter* e *Salmonella* em água de enxágue de frangos utilizando-se a técnica de PCR em tempo real. O mesmo par de oligonucleotídeos iniciadores foram utilizados. Apesar da especificidade já ter sido testada por Lübeck *et al.* (2003) a especificidade desse par de oligonucleotídeos iniciadores foi confirmada por novo teste com 73 cepas as quais não apresentaram nenhuma detecção cruzada (WOLFFS *et al.*, 2007).

Krause *et al.* (2006) validaram um ensaio PCR utilizando TaqMan® e o par de iniciadores OT1559 e 18-1 como ferramenta para produção certificada de frangos livres de *Campylobacter* spp.

O trabalhos mais recentes (OLSEN *et al.*, 2009a; 2009b) utilizaram o par de iniciadores OT1559 e 18-1 para detecção de *Campylobacter* spp. em amostras de ar durante o monitoramento contínuo da colonização de *Campylobacter* spp. em frangos.

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 CEPAS BACTERIANAS

As cepas bacterianas utilizados neste ensaio (tabela 4) pertencem a coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Universidade Estadual de Londrina (UEL), PR e a Coleção de Culturas de Bactérias de Interesse em Saúde (CCBS), Subcoleção de *Campylobacter* (CCAMP) do Laboratório de Zoonoses Bacterianas do Instituto Oswaldo Cruz/ FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ.

As cepas de *Campylobacter* spp. foram enviadas pelo Laboratório de Zoonoses Bacterianas da FIOCRUZ em tubos contendo ágar Brucella (Difco, Sparks, MD, EUA). A ativação das cepas foi realizada em ágar Columbia (Difco) suplementado com 0,4% de carvão ativado em pó, incubadas a 42 °C por 48 h em condições de microaerofilia (5% O<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub> e 85% N<sub>2</sub>) empregando sistema Microaerobac (Probac, São Paulo, SP, Brasil). Para o armazenamento a -85 °C em ultrafreezer (Sanyo, Tokio, Japão), colônias foram retiradas com auxílio de alça bacteriológica e transferidas para microtubos de 1,5 mL contendo 1 mL de solução estéril de água peptonada tamponada (Acumedia, Lansing, Michigan, EUA) e 25% de glicerol (Nuclear, Diadema, São Paulo, Brasil).

As demais cepas bacterianas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos - UEL estavam armazenadas à temperatura ambiente em ágar nutriente (Merck, Darmstadt, Germany) e antes do uso foram ativadas como descrito no item 5.2.1.

**Tabela 4** – Cepas bacterianas<sup>a</sup> utilizadas neste estudo.

<b>Bactérias</b>	<b>Procedência</b>
<i>C. coli</i> CCAMP 1003 (L11)	FIOCRUZ <sup>b</sup>
<i>C. coli</i> CCAMP 1008	FIOCRUZ <sup>b</sup>
<i>C. coli</i> CCAMP 595	FIOCRUZ <sup>b</sup>
<i>C. jejuni</i> ATCC 33291	FIOCRUZ <sup>b</sup>
<i>C. jejuni</i> CCAMP 971	FIOCRUZ <sup>b</sup>
<i>C. jejuni</i> CCAMP 594	FIOCRUZ <sup>b</sup>
<i>C. jejuni</i> CCAMP 1014	FIOCRUZ <sup>b</sup>
<i>Citrobacter freundii</i>	UEL <sup>c</sup>
<i>Enterobacter aerogenes</i>	UEL <sup>c</sup>
<i>Enterobacter cloacae</i>	UEL <sup>c</sup>
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	UEL <sup>c</sup>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	UEL <sup>c</sup>
<i>Morganella morganii</i>	UEL <sup>c</sup>
<i>Proteus mirabilis</i>	UEL <sup>c</sup>
S. Agona	UEL <sup>c</sup>
S. Dublin	UEL <sup>c</sup>
S. Enteritidis	UEL <sup>c</sup>
S. Infantis	UEL <sup>c</sup>
S. Montevideo	UEL <sup>c</sup>
S. Newport	UEL <sup>c</sup>
S. Typhi	UEL <sup>c</sup>
S. Typhimurium	UEL <sup>c</sup>
<i>Shigella sonnei</i>	UEL <sup>c</sup>
<i>Staphylococcus aureus</i>	UEL <sup>c</sup>
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	UEL <sup>c</sup>

<sup>a</sup> Uma cepa de cada espécie bacteriana

<sup>b</sup> FIOCRUZ, Laboratório de Zoonoses Bacterianas do Instituto Oswaldo Cruz Rio de Janeiro, RJ

<sup>c</sup> UEL, Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR

## 5.2 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE – PCR

### 5.2.1 Extração de DNA dos Isolados Bacterianos Utilizados como Controle Positivo

Os isolados bacterianos de *S. Enteritidis* e *C. jejuni* ATCC 33291, estocados como descrito em 5.1, foram cultivados em caldo infusão de cérebro e coração (BHI) (Acumedia) à 37 °C por 24 h e caldo Bolton (CM 0983, Oxoid, Basingstoke, Hampshire, Inglaterra) à 42 °C por 48 h em condições de microaerofilia (5% O<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub> e 85% N<sub>2</sub>) empregando sistema Microaerobac (Probac), respectivamente.

Alíquotas de 1 mL das suspensões bacterianas foram centrifugadas a 16000 × *g* por 10 min. O sedimento foi lavado com 1 mL de água peptonada tamponada (Acumedia, Lansing, Michigan, EUA) estéril, centrifugado novamente por 10 min a 16000 × *g* e resuspenso em 300 µL de solução de lise TZ (ABOLMAATY *et al.*, 2000) com a seguinte constituição: 2% de Triton X-100 (Nuclear), 2,5 mg/mL de azida sódica (Synth, Diadema, São Paulo, Brasil) em Tampão Tris-HCl (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) (Nuclear) 0,1 M pH 8,0. Para a extração do DNA, as suspensões foram fervidas a 100 °C por 10 min, resfriadas em banho de gelo por 5 min e centrifugadas por 5 min a 16000 × *g*. Os sobrenadantes foram usados como DNA alvo para a otimização da mPCR. Os sobrenadantes contendo o DNA foram armazenados a -20 °C.

### 5.2.2 Otimização da mPCR

O par de iniciadores específico para o gênero *Salmonella* utilizado foi Styinva-JHO-2-left e Styinva-JHO-2-right (HOORFAR *et al.*, 2000). Para o gênero *Campyobacter* foi empregado o par de iniciadores OT1559 (UYTTENDAELE *et al.*, 1994; LÜBECK *et al.*, 2003) e 18-1 (VANCAMP *et al.*, 1993; DOCHERTY *et al.*, 1996; LÜBECK *et al.*, 2003). As sequências dos iniciadores utilizados, bem como o tamanho das sequências de DNA amplificadas, estão apresentados na tabela 5.

**Tabela 5** – Características dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados na reação de mPCR para detecção de *Salmonella* spp. e *Campylobacter* spp. amplicon.

Gênero	Gene Alvo	Oligonucleotídeos iniciadores	Sequência 5' – 3'	Tamanho (pb)
<i>Salmonella</i>	<i>InvA</i>	StyinvA-JHO-2-left <sup>a</sup>	TCGTCATTCCATTACCTACC	119
		StyinvA-JHO-2-right <sup>a</sup>	AAACGTTGAAAACTGAGGA	
<i>Campylobacter</i>	rRNA 16S	OT1559 <sup>b</sup>	CTGCTTAACACAAGTTGAGTAGG	287
		18-1 <sup>c</sup>	TTCCTTAGGTACCGTCAGAA	

<sup>a</sup> Hoorfar *et al.* (2000)

<sup>b</sup> Uyttendaele *et al.* (1994); Lübeck *et al.* (2003)

<sup>c</sup> Vancamp *et al.* (1993); Docherty *et al.* (1996); Lübeck *et al.* (2003)

As reações de amplificação foram realizadas com 4,0 µL de DNA, extraído conforme descrito no item 5.2.1, adicionados a uma mistura (16µl) constituída por tampão para PCR 1X (20 mM Tris-HCl, pH 8,4, 50 mM KCl, (Invitrogen, Brasil, São Paulo, SP, Brasil), 10 mM de MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen, Brasil, São Paulo, SP, Brasil), 0,4 mM de dNTPs (Invitrogen Life Technologies, Alameda, CA, EUA), 5 µg de albumina bovina (Inlab, São Paulo, SP, Brasil), 0,3 µM do par de iniciadores StyinvA-JHO-2-left e StyinvA-JHO-2-right (IDT- Integrated DNA Technologies Prodimol, Belo Horizonte, Brasil), 0,25 µM do par de iniciadores OT1559 (IDT- Integrated DNA Technologies/Prodimol, Belo Horizonte, Brasil) e 18-1 (IDT- Integrated DNA Technologies Prodimol, Belo Horizonte, Brasil), 2,0 U de *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen).

A reação de amplificação foi realizada em termociclador (TC-412) (Techne Ltda., Duxford, Cambridge, Inglaterra) e as condições de amplificação foram desnaturação inicial a 95°C por 10 min, seguida de 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 10 s, hibridação a 60°C por 30 s, polimerização da sequência alvo a 72°C por 45 s e polimerização da sequência alvo final de 5 min a 72°C.

A temperatura ótima de hibridação (60°C) foi determinada após realização de PCR com gradiente de temperatura, na qual foram testadas as seguintes temperaturas: 53,1°C; 53,2°C; 53,6°C; 54,3°C; 55,2°C; 56,3°C; 57,4°C; 58,5°C; 59,5°C; 60,4°C; 61°C; 61,4°C. A temperatura de 60°C apresentou a melhor amplificação para ambos os iniciadores sendo essa selecionada para os testes de sensibilidade e especificidade.

### 5.2.3 Análise dos Produtos de Amplificação

Após a PCR, em cada microtubo de 200 µL contendo os produtos de amplificação foram adicionados 4 µL de tampão de amostra Ficoll 400 (Fluka BioChemika, Milwaukee, Wisconsin, EUA) 15%; azul de bromofenol (Synth) 0,25%. Alíquotas de 10 µL dessa mistura foram analisadas em gel de agarose (Pronadisa, Madri, Espanha) a 1,5% acrescidos de 0,02 µL/mL de SYBR® Safe 10,000x em DMSO (Invitrogen). A eletroforese foi realizada em cuba horizontal com tampão Tris borato EDTA [Tris (Invitrogen) 45 mM; ácido bórico (Nuclear) 45 mM, EDTA (Nuclear) 1,25 mM] a 70 V durante 1 h. Como marcador de massa molecular foi utilizado DNA de 100 pb (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). Os produtos de amplificação foram visualizados por luz UV em transiluminador L.Pix (Loccus Biotecnologia Molecular, Cotia, São Paulo, Brasil). O gel foi fotografado em sistema de fotodocumentação L.Pix Image Versão 1.21 (Loccus Biotecnologia Molecular).

### 5.2.4 Avaliação da Especificidade do Ensaio PCR Otimizado

Os diferentes gêneros de bactérias e sorovares de *Salmonella*, apresentados na tabela 4, foram cultivados e a extração de DNA realizada conforme descrito em 5.2.1. Os sobrenadantes contendo o DNA foram utilizados para testar a especificidade do ensaio de mPCR.

As cepas de *S. Enteritidis* e *C. jejuni* ATCC 33291 foram utilizadas em todas as reações como controles positivos.

### 5.2.5 Avaliação da Sensibilidade do Ensaio PCR Otimizado

A sensibilidade de reação foi determinada empregando suspensões de *S. Enteritidis* e *C. jejuni* ATCC 33291 cultivadas conforme descrito no item 5.2.1.

Diluições seriadas foram feitas em água peptonada tamponada (Acumedia), estéril para obtenção de suspensões contendo  $10^0$  a  $10^9$  UFC/mL. As concentrações celulares foram estimadas pelo método de contagem em gotas (MILES; MISRA, 1938).

As suspensões bacterianas de *S. Enteritidis* foram plaqueadas em Xilose Lisina Desoxicolato de Sódio (XLD) (Acumedia) incubadas à 37°C por 24 h. As suspensões de *C. jejuni* ATCC 33291 foram semeadas em ágar Bolton [caldo Bolton (CM 0983, Oxoid) acrescido de 2% de Ágar-ágar (HiMedia, Mumbai, Índia)] e incubadas à 42°C por 48 h em condições de microaerofilia (5% O<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub> e 85% N<sub>2</sub>) empregando sistema Microaerobac (Probac). Essa análise foi feita em triplicata.

Aliquotas de 1 mL de cada diluição foram utilizadas para extração de DNA, conforme descrito no item 5.2.1, e foram utilizadas para determinação da sensibilidade da mPCR.

### 5.3 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DO ENXÁGUE DE CARNE DE FRANGO ARTIFICIALMENTE E NATURALMENTE CONTAMINADO

#### 5.3.1 Enxágue da Pele de Frango e Contaminação Artificial com *S. Enteritidis* e *C. jejuni* ATCC 33291

Amostras de 25 g de pele de frango não contaminada com *Salmonella* spp. e *Campylobacter* spp. foram adicionadas a 225 mL de água peptonada tamponada (Acumedia) e massageadas manualmente por 30 s. Alíquotas de 50 mL e 5 mL desse enxágue foram inoculadas, respectivamente, com suspensões de *S. Enteritidis* e *C. jejuni* ATCC 33291, com aproximadamente  $10^{-1}$  a  $10^9$  UFC/mL, obtidas como descrito em 5.2.5. Para *S. Enteritidis*, os frascos contendo os enxágues de carne de frango contaminados foram incubados a 37°C por 24h. Para *C. jejuni* ATCC 33291, as alíquotas de 5 mL dos enxágues de carne de frango contaminados foram enriquecidas em 45 mL de caldo Bolton (Oxoid) suplementado com *Modified Bolton Broth Selective Supplement* SR0208E (Oxoid) (cefoperazone, 10 mg/500mL; vancomicina, 10 mg/500mL; trimetropim, 10

mg/500mL e anfotericina B, 5 mg/500mL) incubadas à 42°C por 24 h em condições de microaerofilia (5% O<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub> e 85% N<sub>2</sub>) empregando sistema Microaerobac (Probac).

A confirmação das contagens de *Salmonella* spp. e *Campylobacter* spp. nos enxágues de carne de frango artificialmente contaminadas foi realizada seguindo o descrito nos itens 5.3.3 e 5.3.4.

Os experimentos de contaminação artificial das amostras de carne de frango com *Salmonella* spp. e *Campylobacter* spp. foram repetidos três vezes.

### 5.3.2 Análise Microbiológica da Carne de Frango Naturalmente Contaminada

Um total de 50 amostras de carne de frango resfriada adquiridas no comércio de Londrina, foram analisadas. Alíquotas de 25 g de peles de cortes resfriados de frango, tais como, peito, coxa e sobrecoxa de frango foram analisadas. As amostras foram conservadas em câmara fria à temperatura de 4°C até o momento da análise, que não excedeu 24 h após a compra.

A pesquisa de *Salmonella* e *Campylobacter* pela técnica tradicional de cultura está descrita nos itens 5.3.3 e 5.3.4, respectivamente.

### 5.3.3 Pesquisa de *Salmonella* spp.

Após o enriquecimento não seletivo descrito no item 5.3.1, alíquotas de 1,0 mL e 0,1 mL desse enriquecimento não seletivo foram inoculadas, respectivamente, em 10 mL de caldo Tetrionato (TT) (HiMedia) e em 10 mL de caldo Rappaport-Vassiliadis (RV) (HiMedia). O caldo TT foi incubado a 37°C por 24 h e o caldo RV a 42°C por 48 h. Após esses períodos as amostras foram inoculadas nos meios Hektoen (Acumedia) e Xilose Lisina Desoxicolato de sódio (XLD) (Acumedia), meios sólidos seletivos e diferenciais, e incubados a 37°C por 24 h. Colônias características de *Salmonella* spp. que promoveram a descarboxilação da lisina e hidrólise da uréia foram submetidas a mPCR otimizada.

#### 5.3.4 Pesquisa de *Campylobacter* spp.

Após o enriquecimento seletivo descrito no item 5.3.1, alíquotas de 0,1 mL das amostras foram inoculadas em ágar Bolton suplementado com *Modified Bolton Broth Selective Supplement* SR0208E (cefoperazone, 10 mg/500mL; vancomicina, 10 mg/500mL; trimetropim, 10 mg/500mL e anfotericina B, 5 mg/500mL). As placas foram incubadas durante 48 h a 42°C, sob condições de microaerofilia (5% O<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub> e 85% N<sub>2</sub>) empregando sistema Microaerobac (Probac). A identificação das colônias características de *Campylobacter* spp. foi feita pela mPCR otimizada.

### 5.4 AVALIAÇÃO DA MPCR EM AMOSTRAS DE CARNE DE FRANGO ARTIFICIALMENTE E NATURALMENTE CONTAMINADAS

#### 5.4.1 Extração do DNA

Alíquotas de 1 mL do enriquecimento não seletivo de *Salmonella* spp e 1 mL do enriquecimento seletivo de *Campylobacter* spp. foram misturadas e centrifugadas a 16000 × *g* por 10 min. O sedimento foi lavado com 1 mL de água peptonada tamponada (Acumedia) estéril, centrifugado novamente por 10 min a 16000 × *g* e o sedimento foi ressuspensão com 300 µL de solução de lise TZ. A extração do DNA foi realizada como descrito em 5.2.1.

#### 5.4.2 Avaliação da mPCR padronizada

Os sobrenadantes obtidos como descrito no item 5.4.1 foram utilizados como DNA alvo para a mPCR padronizada conforme o item 5.2.2. As análises dos produtos de amplificação foram realizadas conforme o descrito no item 5.2.3.

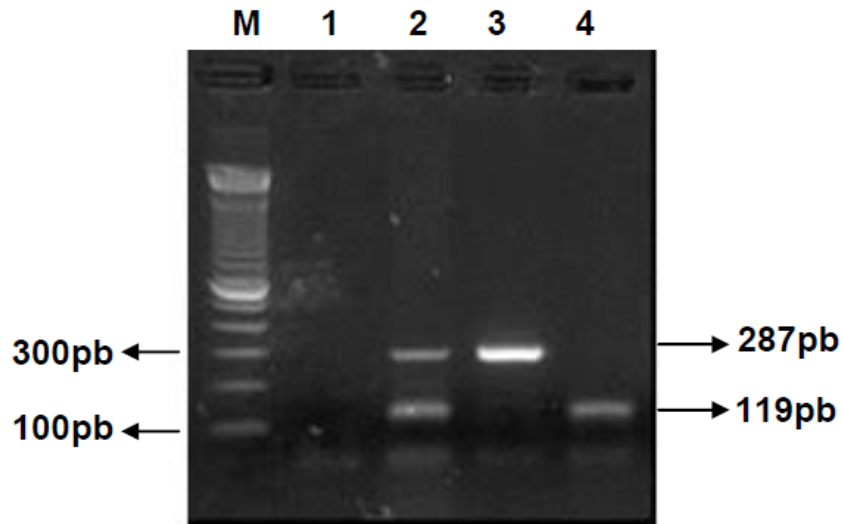
## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho a solução de lise TZ (ABOLMAATY *et al.*, 2000) seguida de fervura foi utilizada para extração de DNA. Esta solução de lise foi testada primeiramente em culturas puras de *Campylobacter* spp. e *Salmonella* spp. e mostrou-se eficiente tanto na extração quanto na amplificação do DNA. A solução também foi utilizada nas amostras de carne de frango apresentando a mesma eficiência. Segundo Abolmaaty *et al.* (2000), a extração de DNA de *S. Enteritidis* com a adição de azida sódica foi mais eficiente que a extração somente com a solução de Triton X - 100. Outros trabalhos também apresentaram sucesso com a utilização da solução de lise TZ (ABOLMAATY *et al.*, 2007; DUODU *et al.*, 2009; LEE; LEVIN, 2009; LUO *et al.*, 2010). O mecanismo pelo qual a azida sódica potencializa a extração de DNA ainda não foi elucidado (ABOLMAATY *et al.*, 2000).

No presente estudo, a detecção de *Campylobacter* spp. e de *Salmonella* spp. nas amostras de carne de frango foi feita após um período de 24h de enriquecimento seletivo e não seletivo, respectivamente. O enriquecimento forneceu condições favoráveis para a multiplicação de *Salmonella* spp. e *Campylobacter* spp. a um número detectável, além de diluir substâncias inibidoras e células não-viáveis. Dados semelhantes já foram observados por diversos pesquisadores em análises de detecção de patógenos em alimentos por PCR (WAY *et al.*, 1993; MAHON *et al.*, 1994; JOFRÉ *et al.*, 2005; CORTEZ *et al.*, 2006; KATZAV *et al.*, 2008; GERMINI *et al.*, 2009; FREITAS *et al.*, 2010; RAHIMI *et al.*, 2010). O enriquecimento traz benefícios como diluição de inibidores, diferenciação entre células viáveis e não viáveis e reparação de células injuriadas apesar de ser uma limitação por aumentar o tempo de análise. A dificuldade de se separar o microorganismo da matriz alimentar e, conseqüentemente, a extração do DNA leva a necessidade de se fazer o enriquecimento para multiplicar as células, aumentar a quantidade de DNA e facilitar a sua extração. O inóculo de aproximadamente  $10^4$  UFC/mL ou g de alimento obtidos com o enriquecimento não seletivo e/ou seletivo são suficientes para garantir a sensibilidade da PCR (MALORNY *et al.*, 2009).

A mPCR, para detecção de *Campylobacter* spp. e *Salmonella* spp., foi testada quanto a sua especificidade após os testes iniciais para definição das concentrações adequadas de oligonucleotídeos iniciadores e composição da mistura

reativa. A mPCR otimizada apresentou especificidade de 100%. Todas as cepas de *Campylobacter* spp. e os sorovares de *Salmonella* spp. testados apresentaram produtos de amplificação de 287 pb e 119 pb, respectivamente (figura 1). Os demais gêneros bacterianos não apresentaram nenhum produto de amplificação.



**Figura 1** – Eletroforese em gel de agarose dos produtos de amplificação utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores específicos para detecção de *Campylobacter* spp. e *Salmonella* spp. M) marcador de massa molecular 100 pb (Invitrogen); 1) representativo de controle negativo; 2) produto da mPCR 3) produto da mPCR utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores OT1559 e 18-1, específicos para o detecção do gênero *Campylobacter*; 4) produtos da mPCR utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores Styinva-JHO-2-left e Styinva-JHO-2-right, específicos para detecção do gênero *Salmonella*. Gel de agarose 1,5% corado com 0,02  $\mu\text{L}/\text{mL}$  de SYBR® Safe 10,000X em DMSO (Invitrogen).

A especificidade dos iniciadores OT1559 e 18-1 para detecção de *C. jejuni*, *C. coli* e *C. lari* foi testada anteriormente por Lübeck *et al.* (2003). A inclusividade foi de 100% e a exclusividade de 97% para um total de 150 cepas de *Campylobacter* testadas, com amplificação observada também para *C. upsaliensis*. Perelle *et al.* (2004), testaram o mesmo par de oligonucleotídeos iniciadores com 39 cepas de *Campylobacter* e nove cepas de outras espécies e a especificidade

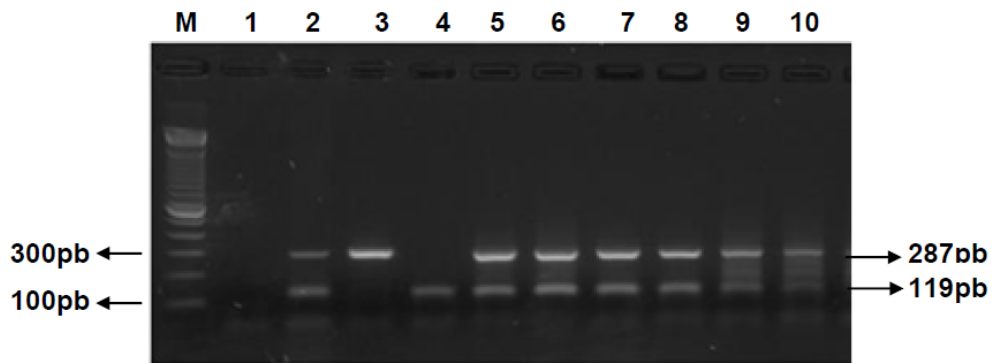
também foi confirmada. Somente uma cepa de *C. upsaliensis* apresentou reação cruzada. Wolffs *et al.* (2007) também confirmaram a especificidade dos iniciadores após a análise de 12 cepas de *Campylobacter* e 61 cepas de outras bactérias.

A especificidade de 100% obtida neste trabalho com os iniciadores Styinva-JHO-2-left e Styinva-JHO-2-right também foi relatada por outros autores Hoorfar, 2000; Rodríguez-Lázaro *et al.* (2003); Nam *et al.* (2005).

A sensibilidade do ensaio multiplex foi testada com diluições seriadas de  $10^7$  a  $<10$  UFC/mL de *C. jejuni* ATCC 33291 e *S. Enteritidis*. Os resultados da PCR mostraram que a sensibilidade do ensaio otimizado foi de  $10^4$  UFC de *C. jejuni* ATCC 33291 e *S. Enteritidis* por mililitro de água peptonada tamponada (figura 2).

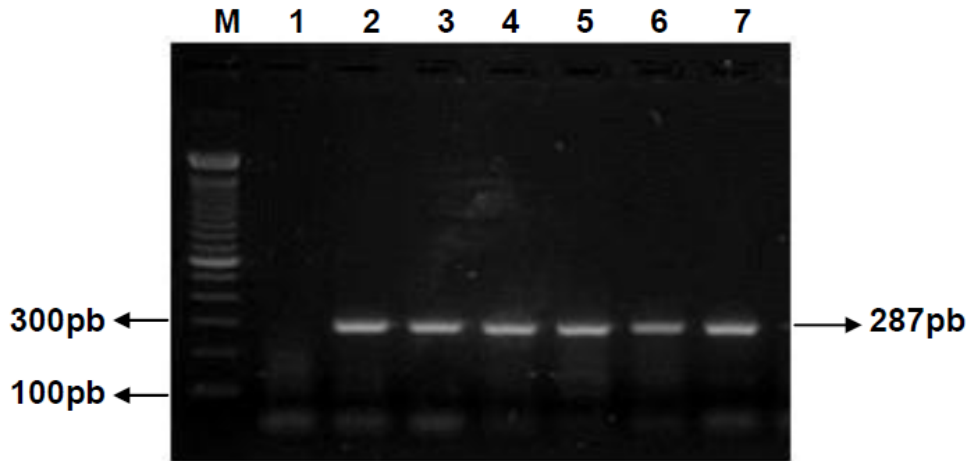
O limite de detecção de  $10^4$  UFC/mL é satisfatório para a mPCR otimizada uma vez que é uma reação de detecção de dois patógenos simultaneamente. Germini *et al.* (2009) otimizaram um ensaio de mPCR para detecção de *Escherichia coli* O175:H7, *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes* com sensibilidade de  $10^6$  UFC/mL de cada patógeno. Katzav *et al.* (2008) encontraram sensibilidade de 700 UFC/mL, porém para detecção de *Campylobacter* em produtos de frango empregando um ensaio PCR não multiplex.

Outros métodos de extração e purificação de DNA, tais como, kits de purificação de DNA, extração com fenol, clorofórmio e álcool isoamílico (15: 14: 1) e precipitação do DNA com etanol e cloreto de sódio, podem ser empregados na tentativa de aumentar a sensibilidade da mPCR padronizada.

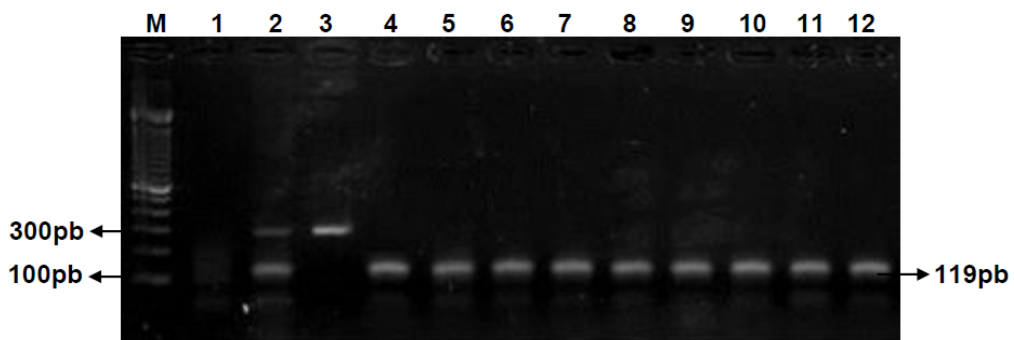


**Figura 2 –** Sensibilidade da mPCR para detecção de *Campylobacter* spp. e *Salmonella* spp. M) Marcador de massa molecular 100 pb (Invitrogen); 1) representativo de controle negativo; 2) produtos da mPCR 3) produto da mPCR utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores OT1559 e 18-1, específicos para o detecção do gênero *Campylobacter*; 4) produto da mPCR utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores Styinva-JHO-2-left e Styinva-JHO-2-right, específicos para detecção do gênero *Salmonella*. 5 - 10) mPCR de DNA extraído de suspensão bacteriana contendo entre 10<sup>7</sup> a 10<sup>2</sup> UFC/mL de *C. jejuni* ATCC 33291 e *S. Enteritidis* respectivamente. Gel de agarose 1,5% corado com 0,02 µL/mL de SYBR® Safe 10,000X em DMSO (Invitrogen).

A mPCR testada com enxágue de pele de frango contaminada com concentrações de 10<sup>7</sup> a 10<sup>-1</sup> UFC/mL de *Campylobacter* spp. e *Salmonella* spp., seguida de enriquecimento seletivo para *Campylobacter* e não seletivo para *Salmonella* apresentou um aumento no limite de detecção desses patógenos em carne de frango. A mPCR otimizada detectou 10<sup>2</sup> UFC/mL de *C. jejuni* ATCC 33291 (figura 3) e 10<sup>0</sup> UFC/mL de *S. Enteritidis* (figura 4) após 24h de enriquecimento. Após 48h de enriquecimento seletivo foi possível detectar 10<sup>0</sup> UFC/mL de *C. jejuni* ATCC 33291.



**Figura 3** – Sensibilidade da mPCR para detecção de *Campylobacter* spp. após 24h de enriquecimento seletivo. M) Marcador de massa molecular 100 pb (Invitrogen); 1) representativo de controle negativo; 2-7) mPCR de DNA extraído de suspensão bacteriana contendo entre 10<sup>7</sup> a 10<sup>2</sup> UFC/mL de *C. jejuni* ATCC 33291. Gel de agarose 1,5% corado com 0,02 µL/mL de SYBR® Safe 10,000X em DMSO (Invitrogen).



**Figura 4** – Sensibilidade da mPCR para detecção de *Salmonella* spp. após 24h de enriquecimento não seletivo. M) Marcador de massa molecular 100 pb (Invitrogen); 1) representativo de controle negativo; 2) produtos da mPCR; 3) produto da mPCR utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores OT1559 e 18-1, específicos para o detecção do gênero *Campylobacter*; 4) produto da mPCR utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores Styinva-JHO-2-left e Styinva-JHO-2-right, específicos para detecção do gênero *Salmonella*.; 5-12) mPCR de DNA extraído de suspensão bacteriana contendo entre contendo 10<sup>7</sup> a 10<sup>0</sup> UFC/mL de *S. Enteritidis*. Gel de agarose 1,5% corado com 0,02 µL/mL de SYBR® Safe 10,000X em DMSO (Invitrogen).

Um total de 28 (56%) amostras de carne de frango adquiridas no comércio foram positivas para *Campylobacter* spp. e duas amostras (4%) foram

positivas para *Salmonella* spp. Esse resultado foi obtido nas análises microbiológicas das amostras e também na mPCR.

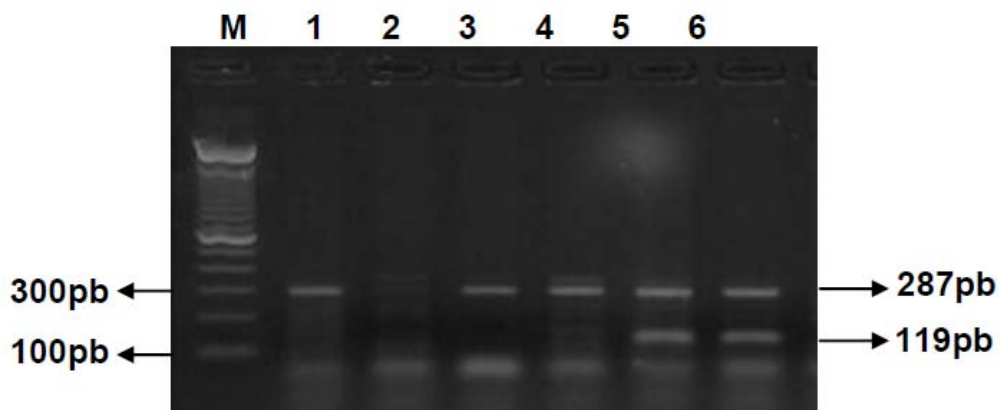
A porcentagem de contaminação das amostras de carne de frango por *Campylobacter* spp. está de acordo com o observado por Maziero e Oliveira (2010) em que 53,3% das 30 amostras refrigeradas analisadas apresentaram resultado positivo para *Campylobacter* spp. Um índice de contaminação por *Campylobacter* spp. de 46,4% de um total de 28 amostras analisadas foi observado por Casaril (2010).

Freitas *et al.* (2010) analisaram 127 carcaças de frango no Distrito Federal e nenhuma foi positiva para *Salmonella* spp. O isolamento de *Salmonella* spp. em carne de frango tem diminuído gradativamente nos últimos 10 anos. No Estado do Paraná, Gaspareto *et al.* (2001) relataram que 20 (20%) das 100 amostras de carne de frango comercializadas na cidade de Londrina, PR estavam contaminadas com *Salmonella* spp. Das 20 amostras positivas, 12 (60%) estavam contaminadas com *S. Enteritidis*. Em 2007, 66 amostras de carne de frango adquiridas no comércio de Londrina foram analisadas quanto à presença de *Salmonella* spp. e nove (13%) estavam contaminadas, não tendo sido identificado nas amostras positivas o sorovar Enteritidis (SILVA *et al.*, 2011). No ano de 2009, segundo dados do Laboratório São Camilo, Maringá, PR, 317 amostras (3,5%) de carne de frango crua incluídas no Programa Nacional de Redução de Patógenos do Ministério da Agricultura e provenientes de aves abatidas no Paraná e Santa Catarina estavam contaminadas com *Salmonella* spp. O sorovar mais isolado foi Minnesota (73 isolados - 23,02%), seguido de Mbandaka (33 isolados - 10,41%) e Enteritidis (30 isolados - 9,46%).

Essa diminuição na frequência de isolamento de *Salmonella* spp. em carne de frango pode ser uma consequência do Programa Nacional de Redução de Patógenos implantado pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) em 2003. O principal objetivo desse Programa é construir um sistema de informações sobre contaminação de frangos e perus com *Salmonella* spp. em todos os estabelecimentos de abate registrados no Serviço de Inspeção Federal (SIF), do Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal (DIPOA). A partir do conhecimento dos locais e frequência de isolamento é possível tomar medidas preventivas com a finalidade de reduzir gradativamente a contaminação de aves por *Salmonella* (BRASIL, 2003).

A diminuição gradativa do isolamento de *Salmonella* spp. pode ter ocorrido também pela vacinação para *S. Enteritidis* das matrizes de corte, o que também justificaria a menor frequência de isolamento de *S. Enteritidis*. Infelizmente, não é possível saber se esta diminuição na porcentagem de contaminação por *Salmonella* spp. e, principalmente, do sorovar *Enteritidis* levou a um impacto positivo na Saúde Pública devido a falta de dados epidemiológicos. No entanto, é muito importante o contínuo monitoramento e a melhoria do diagnóstico de casos esporádicos e de surtos de infecção humana. Além disso, como o sorovar Minnesota tem sido isolado com muita frequência em amostras de carne de frango, é essencial que as autoridades sanitárias avaliem a repercussão desta contaminação na Saúde Pública.

A figura 5 apresenta o resultado da análise por PCR de amostras de carne de frango naturalmente contaminadas com *Campylobacter* spp., contaminadas com *Campylobacter* spp. e *Salmonella* spp. e amostra não contaminada. Não houveram amostras contaminadas somente com *Salmonella* spp. Todas as reações foram realizadas com a amplificação de controles negativos e positivos (*C. jejuni* ATCC 33291 e *S. Enteritidis*) apesar de não estar sendo mostrado na figura abaixo.



**Figura 5 –** Análise de amostras de carne de frango através de mPCR para detecção de *Campylobacter* spp. e *Salmonella* spp. M) Marcador de massa molecular 100 pb (Invitrogen); 1,3 e 4) Amostra naturalmente contaminada com *Campylobacter* spp. 2) amostra negativa para *Campylobacter* spp. e *Salmonella* spp. 5 e 6) Amostras naturalmente contaminadas com *Campylobacter* spp. e *Salmonella* spp. Gel de agarose 1,5% corado com 0,02  $\mu$ L/mL de SYBR® Safe 10,000x em DMSO, (Invitrogen).

Os resultados obtidos neste trabalho reforçam a utilização de mPCR na melhoria do diagnóstico e no controle de qualidade microbiológico, principalmente, de carne de frango que é uma matéria prima perecível muito importante para a balança comercial brasileira.

A identificação fenotípica de *Campylobacter* é limitada devido à existência de isolados bioquimicamente atípicos. Além disso, essa bactéria possui um crescimento fastidioso e assacarolítico, o qual restringe o uso de testes bioquímicos diferenciais. As técnicas microbiológicas tradicionais para detecção de *Salmonella* são demoradas, além da sorotipagem ser feita somente em laboratórios de referência. Portanto, a detecção desses patógenos em poucas horas possibilitaria a todos os elos da cadeia produtiva tomar medidas corretivas adequadas mais rapidamente, na tentativa de evitar a distribuição de alimentos contaminados. Na cadeia de produção de frango a detecção rápida e simultânea de *Salmonella* spp. e *Campylobacter* spp. auxiliaria na tomada de medidas preventivas que possam reduzir a contaminação.

Uma aplicação adicional para esta reação de mPCR é a confirmação simultânea diretamente de colônias isoladas pela técnica tradicional. Assim, este ensaio desenvolvido também pode ser uma alternativa para a confirmação da identificação bioquímica de colônias isoladas na cultura (HOORFAR *et al.*, 2000; JOFRÉ *et al.*, 2005).

## 7 CONCLUSÃO

A mPCR otimizada mostrou ser viável e apresentar sensibilidade satisfatória para detecção de *Campylobacter* spp. e *Salmonella* spp. em carne de frango após 24 horas de enriquecimento.

Os protocolos e os oligonucleotídeos iniciadores selecionados foram eficientes na amplificação dos fragmentos de DNA de 119 pb do gene *InvA* de *Salmonella* spp. e 287 pb do gene rRNA 16S de *Campylobacter* spp.

Houve correlação de 100% entre os resultados obtidos na análise microbiológica e molecular, tanto para as amostras positivas quanto negativas.

A mPCR padronizada neste trabalho é uma alternativa rápida, barata e eficiente para detecção de *Samonella* e *Campylobacter*, que pode ser utilizada em laboratórios de análise de alimentos e clínicos.

## REFERÊNCIAS

- ABOLMAATY, A., GU, W., WITKOWSKY, R., LEVIN, R. E. The use of activated charcoal for the removal of PCR inhibitors from oyster samples. **Journal of Microbiological Methods**, v.68, n.2, p.349-352. 2007.
- ABOLMAATY, A., VU, C., OLIVER, J., LEVIN, R. E. Development of a new lysis solution for releasing genomic DNA from bacterial cells for DNA amplification by polymerase chain reaction. **Microbios**, v.101, n.400, p.181-189. 2000.
- ALCOCER, I., OLIVEIRA, K. M. P. D., VIDOTTO, M. C., OLIVEIRA, T. C. R. M. Discriminação de sorovares de *Salmonella* spp. isolados de carcaças de frango por REP e ERIC-PCR e fagotipagem do sorovar Enteritidis. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v.26, n.2, p.414-420. 2006.
- ALVAREZ, J., SOTA, M., VIVANCO, A. B. N., PERALES, I., CISTERNA, R. N., REMENTERIA, A., GARAIZAR, J. Development of a Multiplex PCR Technique for Detection and Epidemiological Typing of *Salmonella* in Human Clinical Samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, n.4, p.1734-1738. 2004.
- AMRI, A. A., SENOK, A. C., ISMAEEL, A. Y., AL-MAHMEED, A. E., BOTTA, G. A. Multiplex PCR for direct identification of *Campylobacter* spp. in human and chicken stools. **Journal of Medical Microbiology**, v.56, p.1350-1355. 2007.
- ARRACH, N., PORWOLLIK, S., CHENG, P., CHO, A., LONG, F., CHOI, S.-H. , MCCLELLAND, M. *Salmonella* Serovar Identification Using PCR-Based Detection of Gene Presence and Absence. **Journal of Clinical Microbiology**, v.46, n.8, p.2581-2589, 2008.
- BLASER, M. J. Epidemiologic and Clinical Features of *Campylobacter jejuni* Infections. **The Journal of Infectious Diseases** v.176, n.2, p.S103-5, 1997.
- BRASIL. Instrução Normativa nº 70, de 06 de outubro de 2003. MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Institui o Programa de Redução de Patógenos - Monitoramento Microbiológico e Controle de *Salmonella* spp. em Carcaças de Frangos e Perus. Diário Oficial da União, de 10 de outubro de 2003, Seção 1, p. 9.
- BRENNER, F. W., VILLAR, R. G., ANGULO, F. J.,TAUXE, R., SWAMINATHAN, B. *Salmonella* Nomenclature. **Journal of Clinical Microbiology**, v.38, n.7, p.2465-2467, 2000.
- CALIXTO, A. E. R., SERAFINI, A. B., KIPNIS, A., ANDRÉ, M. C. D. P. B. Prevalência de *Salmonella* e ocorrência de cepas resistentes a antimicrobianos, em insumos de rações para aves preoduzidos por um matadouro - frigorífico com fiscalização permanente, em Goiânia, GO. **Revista Higiene Alimentar**, v.16, n.101, p.56-61, 2002.

CANDRIAN, U. Polymerase chain reaction in food microbiology **Journal of Microbiological Methods** v.23, p.89-103, 1995.

CASARIL, K. B. P. B. **Padronização de PCR tradicional e em tempo real para detecção de *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* em alimentos.** 2010. 100 f. Tese. (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2010.

CDC. *Campylobacter* General Information. 2009a. Disponível em: <[http://www.cdc.gov/nczved/dfbmd/disease\\_listing/campylobacter\\_gi.html#2](http://www.cdc.gov/nczved/dfbmd/disease_listing/campylobacter_gi.html#2)>. Acesso em: 12 jul. 2009.

\_\_\_\_\_. Salmonellosis. 2009b. Disponível em: <[http://www.cdc.gov/nczved/dfbmd/disease\\_listing/salmonellosis\\_gi.html#10](http://www.cdc.gov/nczved/dfbmd/disease_listing/salmonellosis_gi.html#10)>. Acesso em: 20 jul. 2009.

CHAMBERLAIN, J. R., GIBBS R. A., RANIER J. E., NGUYEN P. N., AND CASKEY C. T., Deletion Screening of the Duchenne Muscular Dystrophy Locus Via Multiplex DNA Amplification. **Nucleic Acids Research**. v.16, n. 23, p. 11141-11156, 1988.

CHEN, W., MARTINEZ, G., MULCHANDANI, A. Molecular Beacons: A Real-Time Polymerase Chain Reaction Assay for Detecting *Salmonella*. **Analytical Biochemistry**, v.280, n.1, p.166-172, 2000.

CHIU, C.-H., OU, J. T. Rapid Identification of *Salmonella* Serovars in Feces by Specific Detection of Virulence Genes, *invA* and *spvC*, by an Enrichment Broth Culture-Multiplex PCR Combination Assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v.34, n.10, p.2619-2622. 1996.

CLOAK, O. M., FRATAMICO, P. M. A Multiplex Polymerase Chain Reaction for the Differentiation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from a Swine Processing Facility and characterization of Isolates by Pulsed-Field Gel Electrophoresis and Antibiotic Resistance Profiles. **Journal of Food Protection**, v. 65, n. 2, p. 266-273, 2002.

CORTEZ, A. L. L., CARVALHO, A. C. F. B., IKUNO, A. A., BÜRGER, K. P., VIDAL-MARTINS, A. M. C. Identification of *Salmonella* spp. isolates from chicken abattoirs by multiplex-PCR. **Research in Veterinary Science**, v.81, p.340-344, 2006.

DEBRETSON, A., HABTEMARIAM, T., WILSON, S., NGANWA, D., YEHUDAESHET, T. Real-time PCR assay for rapid detection and quantification of *Campylobacter jejuni* on chicken rinses from poultry processing plant. **Molecular and Cellular Probes**, v.21, p.177-181, 2007.

DOCHERTY, L., ADAMS, M. R., PATEL, P., MCFADDEN, J. The magnetic immunopolymerase chain reaction assay for the detection of *Campylobacter* in milk and poultry. **Letters in Applied Microbiology**, v.22, p.288-292, 1996.

DUNKLEY, K. D., CALLAWAY, T. R., CHALOVA, V. I., MCREYNOLDS, J. L., HUMB, M. E., DUNKLEY, C. S., KUBENA, L. F., NISBET, D. J., RICKE, S. C. Foodborne *Salmonella* ecology in the avian gastrointestinal tract. **Anaerobe**, v.15, p.26-35, 2009.

DUODU, S., MEHMETI, I., HOLST-JENSEN, A., LONCAREVIC, S. Improved Sample Preparation for Real-Time PCR Detection of *Listeria monocytogenes* in Hot-Smoked Salmon using Filtering and Immunomagnetic Separation Techniques. **Food Anal. Methods**, v.2, p.23-29, 2009.

ELLINGSON, J. L. E., ANDERSON, J. L., CARLSON, S. A., SHARMA, V. K. Twelve hour real-time PCR technique for the sensitive and specific detection of *Salmonella* in raw and ready-to-eat meat products. **Molecular and Cellular Probes**, v.18, p.51-57, 2004.

ESPINOZA-MEDINA, I. E., RODRÍGUEZ-LEYVA, F. J., VARGAS-ARISPURO, I., ISLAS-OSUNA, M. A., ACEDO-FÉLIX, E., MARTÍNEZ-TÉLLEZ, M. A. PCR identification of *Salmonella*: potential contamination sources from production and postharvest handling of cantaloupes. **Journal of Food Protection**, v.69, n.6, p.1422-1425, 2006.

EYERS, M., CHAPPELLE, S., CAMP, G. V., GOOSSENS, H., WACHTER, R. D. Discrimination among Thermophilic *Campylobacter* Species by Polymerase Chain Reaction Amplification of 23S rRNA Gene Fragments. **Journal of Clinical Microbiology**, v.31, n.12, p.3340-3343, 1993.

FORSYTHE, S. J., **Microbiologia da segurança alimentar**. 1 ed. São Paulo: Artmed Editora, 2002. 424 p.

FRANCO, B. D. G. D. M., LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2002. 182 p.

FREITAS, C. G. D., SANTANA, Â. P., SILVA, P. H. C. D., GONÇALVES, V. S. P., BARROS, M. D. A. F., TORRES, F. A. G., MURATA, L. S., PERECMANIS, S. PCR multiplex for detection of *Salmonella* Enteritidis, Typhi and Typhimurium and occurrence in poultry meat **International Journal of Food Microbiology**, v.139, n.1-2, p.15-22, 2010.

GALÁN, J. E., GINOCCHIO, C., COSTEAS, P. Molecular and Functional Characterization of the *Salmonella* Invasion Gene *invA*: Homology of InvA to Members of a New Protein Family. **Journal of Bacteriology**, v.174, n.13, p.4338-4349, 1992.

GASPARETO, K. M. P. O., COSER, S., HERRERO, F., GUIMARÃES, I. G., FERNANDEZ, S., OLIVEIRA, T. C. R. M. Sorotipos de *Salmonella* isolados de carcaças de frango e avaliação da susceptibilidade a antimicrobianos. **Revista de Ciências Farmacêuticas**, v.22, n.2, p.185-199, 2001.

- GERMINI, A., MASOLA, A., CARNEVALI, P., MARCHELLI, R. Simultaneous detection of *Escherichia coli* O175:H7, *Salmonella* spp., and *Listeria monocytogenes* by multiplex PCR. **Food Control**, v.20, p.733-738, 2009.
- GIESENDORF, B. A. J., QUINT, W. G. V., HENKENS, M. H. C., STEGEMAN, H., HUF, F. A., NIESTERS, H. G. M. Rapid and Sensitive Detection of *Campylobacter* spp. in Chicken Products by Using the Polymerase Chain Reaction. **Applied and Environmental Microbiology**, v.58, n.12, p.3804-3808, 1992.
- GÓMEZ-DUARTE, O. G., BAI, J., NEWELL, E. Detection of *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio cholerae*, and *Campylobacter* spp. enteropathogens by 3-reaction multiplex polymerase chain reaction. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.63, p.1-9, 2009.
- GRIMONT, P. A. D., WEILL, F.-X. **Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars**. Paris: Instituto Pasteur, 2007. 166 p.
- GUTELL, R. R., LARSEN, I., WOESE, C. R. Lessons from an Evolving rRNA: 16S and 23S rRNA Structures from a Comparative Perspective. **Microbiological Reviews**, v.58, n.1, p.10-26, 1994.
- HEIN, I., FLEKNA, G., KRASSNIG, M., WAGNER, M. Real-time PCR for the detection of *Salmonella* spp. in food: An alternative approach to a conventional PCR system suggested by the FOOD-PCR project. **Journal of Microbiological Methods**, v.66, p.538-547, 2006.
- HENSEL, M., HINSLEY, A. P., NIKOLAUS, T., SAWERS, G., BERKS, B. C. The genetic basis of tetrathionate respiration in *Salmonella* Typhimurium. **Molecular Microbiology**, v.32, n.2, p.275-287, 1999.
- HOFER, E., FILHO, S. J. S., REIS, E. M. F. Prevalência de sorovares de *Salmonella* isolados de aves no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.17, n.2, p.55-62, 1997.
- HOORFAR, J., AHRENS, P., RÅDSTRÖM, P. Automated 5' Nuclease PCR Assay for Identification of *Salmonella enterica*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.38, n.9, p.3429-3435, 2000.
- HUMPHREY, T., O'BRIEN, S., MADSEN, M. Campylobacters as zoonotic pathogens: A food production perspective. **International Journal of Food Microbiology**, v.117, p.237-257, 2007.
- JACKSON, C. J., FOX, A. J., JONES, D. M. A novel polymerase chain reaction assay for the detection and speciation of thermophilic *Campylobacter* spp. **Journal of Applied Bacteriology**, v.81, p.467-473, 1996.
- JOFRÉ, A., MARTIN, B., GARRIGA, M., HUGAS, M., PLA, M., RODRÍGUEZ-LÁZARO, D., AYMERICH, T. Simultaneous detection of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* by multiplex PCR in cooked ham. **Food Microbiology**, v.22, p.109-115, 2005.

- KANKI, M., SAKATA, J., TAGUCHI, M., KUMEDA, Y., ISHIBASHI, M., KAWAI, T., KAWATSU, K., YAMASAKI, W., INOUE, K., MIYAHARA, M. Effect of sample preparation and bacterial concentration on *Salmonella enterica* detection in poultry meat using culture methods and PCR assaying of preenrichment broths. **Food Microbiology**, v.26, p.1-3, 2009.
- KATZAV, M., ISOHANNI, P., LUND, M., HAKKINEN, M., LYHS, U. PCR assay for the detection of *Campylobacter* in marinated and non-marinated poultry products. **Food Microbiology**, v.25, p.908-914, 2008.
- KOTTWITZ, L. B. M., OLIVEIRA, T. C. R. M., ALCOCER, I., FARAH, S. M. D. S. S., ABRAHÃO, W. S. M., RODRIGUES, D. D. P. Avaliação epidemiológica de surtos de salmonelose ocorridos no período de 1999 a 2008 no Estado do Paraná, Brasil **Acta Scientiarum**, v.32, n.1, p.9-15, 2010.
- KRASCENICSOVÁ, K., PIKNOVÁ, L., KAČLÍKOVÁ, E., KUČHTA, T. Detection of *Salmonella enterica* in food using two-step enrichment and real-time polymerase chain reaction. v.46, p.483-487, 2008.
- KRAUSE, M., JOSEFSEN, M. H., LUND, M., JACOBSEN, N. R., BRORSEN, L., MOOS, M., STOCKMARR, A., HOORFAR, J. Comparative, Collaborative, and On-Site Validation of a TaqMan PCR Method as a Tool for Certified Production of Fresh, *Campylobacter*-Free Chickens. **Applied and Environmental Microbiology**, v.72, n.8, p.5463-5468, 2006.
- KUROWSKI, P. B., TRAUB-DARGATZ, J. L., MORLEY, P. S., GENTRY-WEEKS, C. R. Detection of *Salmonella* spp in fecal specimens by use of real-time polymerase chain reaction assay. **American Journal of Veterinary Research**, v.63, n.9, p.1265-1268. 2002.
- LEADER, B. T., FRYE, J. G., HU, J., FEDORKA-CRAY, P. J., BOYLE, D. S. High-throughput Molecular Determination of *Salmonella enterica* Serovars using Multiplex PCR and Capillary Electrophoresis Analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, 2009.
- LEE, J.-L., LEVIN, R. E. Discrimination of viable and dead *Vibrio vulnificus* after refrigerated and frozen storage using EMA, sodium deoxycholate and real-time PCR. **Journal of Microbiological Methods**, v.79, n.2, p.184-188. 2009.
- LEE, S. Y., OH, S. S. W., CHUNG, H. J., REYES-DE-CORCUERA, J. I., POWERS, J. R., KANG, D. H. Reduction of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis on the surface of raw shelled almonds by exposure to steam. **Journal of Food Protection**, v.69 n.3, p.591-595, 2006.
- LINTON, D., OWEN, R. J., STANLEY, J. Rapid identification by PCR of the genus *Campylobacter* and of five *Campylobacter* species enteropathogenic for man and animals. **Res. Microbiol.**, v.147, p.707-718, 1996.

- LOGAN, J. M. J., EDWARDS, K. J., SAUNDERS, N. A., STANLEY, J. Rapid Identification of *Campylobacter* spp. by Melting Peak Analysis of Biprobcs in Real-Time PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v.39, n.6, p.2227-2232, 2001.
- LÜBECK, P. S., WOLFFS, P., ON, S. L. W., AHRENS, P., RADSTRÖM, P., HOORFAR, J. Toward an International Standard for PCR-Based Detection of Food-Borne Thermotolerant *Campylobacter*s: Assay Development and Analytical Validation. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, n.9, p.5664-5669, 2003.
- LUND, M., NORDENTOFT, S., PEDERSEN, K., MADSEN, M. Detection of *Campylobacter* spp. in Chicken Fecal Samples by Real-Time PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, n.11, p.5125-5132, 2004.
- LUO, J.-F., LIN, W.-T., GUO, Y. Method to detect only viable cells in microbial ecology. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.86, n.1, p.377-384, 2010.
- MAHON, J., MURPHY, C. K., JONES, P. W., BARROW, P. A. Comparison of multiplex PCR and standard bacteriological methods of detecting *Salmonella* on chicken skin. **Letters in Applied Microbiology**, v.19, p.169-172, 1994.
- MALORNY, B., COOK, N., D'AGOSTINO, M., MEDICI, D. D., CROCI, L., ABDULMAWJOOD, A., FACH, P., KARPISKOVA, R., AYMERICH, T., KWAITEK, K., KUCHTA, T., HOORFAR, J. Multicenter Validation of PCR-Based Method for Detection of *Salmonella* in Chicken and Pig Samples. **Journal of AOAC International**, v.87, n.4, p.861-866, 2004a.
- MALORNY, B., HOORFAR, J., BUNGE, C., HELMUTH, R. Multicenter Validation of the Analytical Accuracy of *Salmonella* PCR: towards an International Standard. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, n.1, p.290-296, 2003.
- MALORNY, B., HUEHN, S., DIECKMANN, R., KRÄMER, N., HELMUTH, R. Polymerase Chain Reaction for the Rapid Detection and Serovar Identification of *Salmonella* in Food and Feeding Stuff. **Food Anal. Methods**, v.2, p.81-95, 2009.
- MALORNY, B., PACCASSONI, E., FACH, P., BUNGE, C., MARTIN, A., HELMUTH, R. Diagnostic Real-Time PCR for Detection of *Salmonella* in Food. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, n.12, p.7046-7052, 2004b.
- MAZIERO, M. T., OLIVEIRA, T. C. R. M. Effect of refrigeration and frozen storage on the *Campylobacter jejuni* recovery from naturally contaminated broiler carcasses. **Brazilian Journal of Microbiology** v.41, p.501-505, 2010.
- MEAD, G. *Campylobacter* update - the challenge. **International Poultry Production**, v.12, n.4, p.26-29, 2004.
- MILES, A. A., MISRA, S. S. The estimation of the bactericidal power of the blood. **Journal of Hygiene**, v.38, p.732-748, 1938.

MULLIS, K. B., FALOONA, F. A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerasecatalyzed chain reaction. **Methods in enzymology**, v.155, p.335-350, 1987.

NAM, H.-M., SRINIVASAN, V., GILLESPIE, B. E., MURINDA, S. E., OLIVER, S. P. Application of SYBR green real-time PCR assay for specific detection of *Salmonella* spp. in dairy farm environmental samples. **International Journal of Food Microbiology**, v.102, p.161-171, 2005.

NAYAK, R., STEWART, T. M., NAWAZ, M. S. PCR identification of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* by partial sequencing of virulence genes. **Molecular and Cellular Probes**, v.19, p.187-193, 2005.

O'REGAN, E., MCCABE, E., BURGESS, C., MCGUINNESS, S., BARRY, T., DUFFY, G., WHYTE, P., FANNING, S. Development of a real-time multiplex PCR assay for the detection of multiple *Salmonella* serotypes in chicken samples. **BMC Microbiology** v.8, p.156, 2008.

OLAH, P. A., SHERWOOD, J. S., LOGUE, C. M. Molecular analysis of *Salmonella* isolates recovered from processed turkey carcasses. **Journal of Food Protection**, v.68, p.845-849, 2005.

OLIVEIRA, T. C. R. M., BARBUT, S., GRIFFITHS, M. W. Detection of *Campylobacter jejuni* in naturally contaminated chicken skin by melting peak analysis of amplicons in real-time PCR. **International Journal of Food Microbiology**, v.104, p.105-111, 2005.

OLSEN, K. N., LUND, M., SKOV, J., CHRISTENSEN, L. S., HOORFAR, J. Detection of *Campylobacter* Bacteria in Air Samples for Continuous Real-Time Monitoring of *Campylobacter* Colonization in Broiler Flocks. **Applied and Environmental Microbiology**, v.75, n.7, p.2074–2078, 2009a.

\_\_\_\_\_. Towards real-time monitoring of broiler flocks: detection of *Campylobacter* in air samples for continuous monitoring of *Campylobacter* colonization in broiler flocks. **Applied and Environmental Microbiology**, 2009b.

OMICCIOLI, E., AMAGLIANI, G., BRANDI, G., MAGNANI, M. A new platform for Real-Time PCR detection of *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157 in milk. **Food Microbiology**, v.26, p.615-622, 2009.

PARK, S. F. The physiology of *Campylobacter* species and its relevance to their role as foodborne pathogens. **International Journal of Food Microbiology**, v.74, n.3, p.177-188, 2002.

PEPE, T., DE DOMINICIS, R., ESPOSITO, G., VENTRONE, I., FRATAMICO, P. M., CORTESI, M. L. Detection of *Campylobacter* from Poultry Carcass Skin Samples at Slaughter in Southern Italy. **Journal of Food Protection**, v.72, n.8, p.1718-1721, 2009.

- PERELLE, S., JOSEFSEN, M., HOORFAR, J., DILASSER, F., GROUT, J., FACH, P. A LightCycler real-time PCR hybridization probe assay for detecting food-borne thermophilic *Campylobacter*. **Molecular and Cellular Probes**, v.18, p.321–327, 2004.
- PERRY, L., HEARD, P., KANE, M., KIM, H., SAVIKHIN, S., DOMÍNGUEZ, W., APPLGATE, B. Application of multiplex Polymerase Chain Reaction to the detection of pathogens in food. **Journal of Rapid Methods & Automation in Microbiology**, v.15, p.176-198, 2007.
- POPOFF, M. Y., BOCKEMÜHL, J., GHEESLING, L. L. Supplement 2002 (no. 46) to the Kauffmann–White scheme. **Research in Microbiology** v.155, p.568-570, 2004.
- PUI, C. F., WONG, W. C., CHAI, L. C., NILLIAN, E., GHAZALI, F. M., CHEAH, Y. K., NAKAGUCHI, Y., NISHIBUCHI, M., RADU, S. Simultaneous detection of *Salmonella* spp., *Salmonella* Typhi and *Salmonella* Typhimurium in sliced fruits using multiplex PCR. **Food Control**, v.In Press, Corrected Proof, 2010.
- QUETZ, J. D. S., LIMA, I. F. N., HAVT, A., DE CARVALHO, E. B., LIMA, N. L., SOARES, A. M., MOTA, R. M. S., GUERRANT, R. L., LIMA, A. A. M. *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in children from communities in Northeastern Brazil: molecular detection and relation to nutritional status. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.67, n.3, p.220-227, 2010.
- RAHIMI, E., MOMTAZ, H., BONYADIAN, M. PCR detection of *Campylobacter* sp. from turkey carcasses during processing plant in Iran. **Food Control**, v.21, n.5, p.692-694, 2010.
- RAHN, K., GRANDIS, S. A. D., CLARKE, R. C., MCEWEN, S. A., GALÁN, J. E., GINOCCHIO, C., III, R. C., GYLES, C. L. Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella typhimurium* by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*. **Molecular and Cellular Probes**, v.6, p.271-279, 1992.
- RODRÍGUEZ-LÁZARO, D., HERNÁNDEZ, M., ESTEVE, T., HOORFAR, J., PLA, M. A rapid and direct real time PCR-based method for identification of *Salmonella* spp. **Journal of Microbiological Methods**, v.54, p.381-390, 2003.
- SALOMONSSON, A. C., ASPÁN, A., JOHANSSON, S., HEINO, A., HÄGGBLÖM, P. E. R. *Salmonella* detection by polymerase chain reaction after pre-enrichment of feed samples. **Journal of Rapid Methods & Automation in Microbiology**. v.13, p.96-110, 2005.
- SCHODER, D., SCHMALWIESER, A., SCHAUBERGER, G., KUHN, M., HOORFAR, J., WAGNER, M. Physical characteristics of six new thermocycles. **Clin Chem**, v.49, p.960-963, 2003.

SHELOBOLINA, E. S., SULLIVAN, S. A., O'NEILL, K. R., NEVIN, K. P., LOVLEY, D. R. Isolation, Characterization, and U(VI)-Reducing Potential of a Facultatively Anaerobic, Acid-Resistant Bacterium from Low-pH, Nitrate- and U(VI)-Contaminated Subsurface Sediment and Description of *Salmonella subterranea* sp. nov. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, n.5, p.2959-2965, 2004.

SILVA, D. S. P. **Detecção simultânea de Salmonella spp. e Samonella Enteritidis em carcaças de frango por reação em cadeia da polimerase**. 2008. 53 f. Dissertação. (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2008.

SILVA, D. S. P., CANATO, T., MAGNANI, M., ALVES, J., HIROOKA, E. Y. , OLIVEIRA, T. C. R. M. Multiplex PCR for simultaneous detection of *Salmonella* spp. and *Salmonella* Enteritidis in food. **International Journal of Food Science & Technology**. 2011 (no prelo).

SIMMONS, M., HIETT, K. L., STERN, N. J., FRANK, J. F. Comparison of poultry exudate and carcass rinse sampling methods for the recovery of *Campylobacter* spp. subtypes demonstrates unique subtypes recovered from exudate. **Journal of Microbiological Methods** v.74, p.89-93, 2008.

SOUMET, C., ERMEL, G., ROSE, V., ROSE, N., DROUIN, P., SALVAT, G., COLIN, P. Identification by a multiplex PCR-based assay of *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Enteritidis strains from environmental swabs of poultry houses. **Letters in Applied Microbiology** v.29, p.1-6, 1999.

SU, L.-H., CHIU, C.-H. *Salmonella*: Clinical importance and evolution of nomenclature. **Chang Gung Medical Journal**, v.30, n.3, p.210-219, 2007.

UBA. **Relatório Anual 2009/2010 da União Brasileira de Avicultura** ed. 2009.

Disponível em:

<[http://www.abef.com.br/noticias\\_portal/exibenoticia.php?notcodigo=2041](http://www.abef.com.br/noticias_portal/exibenoticia.php?notcodigo=2041)>. Acesso em: 10 set. 2010.

UYTTENDAELE, M., SCHUKKINK', R., GEMEN', B. V., DEBEVERE, J. Identification of *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* and *Campylobacter lari* by the nucleic acid amplification system NASBAR. **Journal of Applied Bacteriology**, v.77, p.694-701, 1994.

VANCAMP, G., FIERENS, H., VANDAMME, P., GOOSENS, H., HUYGHEBAERT, A., WACHTER, R. D. Identification of enteropathogenic *Campylobacter* species by oligonucleotide probes and polymerase chain reaction based on 16s rRNA genes. **Systemic and Applied Microbiology**, v.16, p.30-36, 1993.

VANTARAKIS, A., KOMNINO, G., VENIERI, D., PAPAPETROPOULOU, M. Development of a multiplex PCR detection of *Salmonella* spp. and *Shigella* spp. in mussels. **Letters in Applied Microbiology** v.31, p.105-109, 2000.

VOLLENHOFER-SCHRUMPF, S., BURESCH, R., UNGER, G., STAHL, N., FRÄNZL, G., SCHINKINGER, M. Detection of *Salmonella* spp., *Escherichia Coli* O157, *Listeria Monocytogenes* and *Campylobacter* spp. in Chicken Samples by Multiplex Polymerase Chain Reaction and Hybridization Using the Genegen Major Food Pathogens Detection Kit **Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology**, v.13, p.148-176, 2005.

WAY, J. S., JOSEPHSON, K. L., PILLAI, S. D., ABBASZADEGAN, M., GERBA, C. P., PEPPER, I. L. Specific Detection of *Salmonella* spp. by Multiplex Polymerase Chain Reaction. **Applied and Environmental Microbiology**, v.59, n.5, p.1473-1479, 1993.

WHO. FAO/WHO Expert Meeting on *Salmonella* and *Campylobacter* in chicken meat, 4 – 8.May 2009. ed. 2009. Disponível em: <<http://www.who.int/foodsafety/micro/jemra/meetings/may09/en/index.html>>. Acesso em: 20 jul. 2009.

WISESSOMBAT, S., INTHAGARD, J., KITTINIYOM, K., SRIMANOTE, P., WONGLUMSOM, W., VORAVUTHIKUNCHAI, S. P. Multiplex pcr for direct identification of thermophilic *Campylobacter*, *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* and *C. upsaliensis* and simultaneous detection of *cdtB* gene. v.17, p.438-454, 2009.

WOLFFS, P., NORLING, B., HOORFAR, J., GRIFFITHS, M., RÅDSTRÖM, P. Quantification of *Campylobacter* spp. in Chicken Rinse Samples by Using Flotation prior to Real-Time PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, n.10, p.5759-64, 2005.

WOLFFS, P. F. G., GLENCROSS, K., NORLING, B., GRIFFITHS, M. W. Simultaneous quantification of pathogenic *Campylobacter* and *Salmonella* in chicken rinse fluid by a flotation and real-time multiplex PCR procedure. **International Journal of Food Microbiology**, v.117, p.50-54, 2007.

YAN, S. S., PENDRAK, M. L., FOLEY, S. L., POWERS, J. H. *Campylobacter* infection and Guillain–Barré syndrome: public health concerns from a microbial food safety perspective. **Clinical and Applied Immunology Reviews**, v.5, p.285-305, 2005.

## **ANEXOS**

## ANEXO A – FLUXOGRAMA DE ANÁLISE DE AMOSTRAS DE CARNE DE FRANGO

