



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

KÉRLEY BRAGA PEREIRA BENTO CASARIL

**PADRONIZAÇÃO DE PCR TRADICIONAL E EM TEMPO
REAL PARA DETECÇÃO DE *Campylobacter jejuni* E
Campylobacter coli EM ALIMENTOS**

Londrina
2010

KERLEY BRAGA PEREIRA BENTO CASARIL

**PADRONIZAÇÃO DE PCR TRADICIONAL E EM TEMPO
REAL PARA DETECÇÃO DE *Campylobacter jejuni* E
Campylobacter coli EM ALIMENTOS**

Tese apresentada ao Programa de Mestrado e Doutorado em Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciência de Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Tereza Cristina Rocha Moreira de Oliveira

Co-orientadora: Profa. Dra. Gislayne Trindade Vilas-Bôas

Londrina
2010

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

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

B478p Casaril, Kérley Braga Pereira Bento

Padronização de PCR tradicional e em tempo real para detecção
de *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coll* em alimentos /
Kérley Braga Pereira Bento Casaril. – Londrina, 2010.
96 f.

Orientador: Tereza Cristina Rocha Moreira de Oliveira.

Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Universidade
Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de
Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, 2010.

Inclui bibliografia.

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

CDU 641:579

KERLEY BRAGA PEREIRA BENTO CASARIL

**PADRONIZAÇÃO DE PCR TRADICIONAL E EM TEMPO REAL
PARA DETECÇÃO DE *Campylobacter jejuni* E *Campylobacter coli* EM
ALIMENTOS**

Tese apresentada ao Programa de Mestrado e Doutorado em Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciência de Alimentos.

COMISSÃO EXAMINADORA



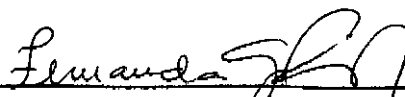
Prof. Dra. Jacinta Sanchez Pelayo
Universidade Estadual de Londrina



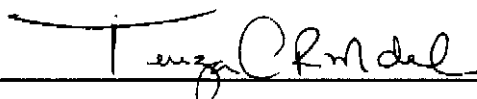
Prof. Dra. Renata Katsuko Takayama Kobayash
Universidade Estadual de Londrina



Prof. Dra. Snell Fumie Yamada Ogatta
Universidade Estadual de Londrina



Dra. Fernanda Gonzales Paiao
Universidade Estadual de Londrina



Prof. Dra. Tereza Cristina Rocha Moreira de Oliveira
Universidade Estadual de Londrina

Londrina, 25 de junho de 2010

*Aos meus pais, João e Berenice,
por me concederem a oportunidade de estudar
e me apoiarem em todos os momentos,*
DEDICO

*Ao Carlos
e aos meus irmãos, Clésio, Cláudia e Priscila*
OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo seu infinito amor, graça e misericórdia, pois apesar dos momentos de angústia colocou os meus pés sobre a rocha e me firmou os passos.

À Universidade Estadual de Londrina e ao Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, pelas oportunidades.

À Universidade Estadual do Oeste do Paraná e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela oportunidade e ajuda financeira.

À professora Tereza Cristina Rocha Moreira de Oliveira pela orientação, pelas valiosas sugestões e críticas, pela disposição e paciência durante a realização deste trabalho.

À professora Çisfayne Trindade Vilas-Bôas pelas co-orientações, pelo grande incentivo, pelas valiosas sugestões e críticas e, sobretudo, pela amizade

À Doutora Francismar Corrêa Marcelino pela contribuição, especialmente no desenvolvimento dos ensaios PCR em tempo real, pela leitura da tese, pelas sugestões e críticas.

Aos membros da banca examinadora Doutora Francismar Corrêa Marcelino, Professora Sueli Fumie Yamada Ogatta, Professora Jacinta Sanchez Pelayo e Doutora Fernanda Çonzafes Paião, pelas correções e sugestões para o enriquecimento do trabalho.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária — Embrapa Soja de Londrina por permitir que eu realizasse parte dos experimentos nos laboratórios de Biotecnologia Vegetal.

*Ao Laboratório Central do Estado do Paraná (LACEN) pela doação do isolado de *Campylobacter jejuni*.*

*À Doutora Eliana Scarcelli Pinheiro do Instituto Biológico de São Paulo pela doação dos isolados de *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli**

*À Doutora Ana Luzia Lauria Filgueiras do Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRVZ) do Rio de Janeiro pela doação dos isolados de *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli**

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos pelo conhecimento transmitido.

À professora Sueli Fumie Yamada Ogatta pelas orientações no início do trabalho com Biologia Molecular e montagem do laboratório.

À professora Leda Maria Kpefbfinger Sodré pelas orientações no início do trabalho com Biologia Molecular, por sua generosidade e por me ensinar que ser professor ultrapassa as barreiras da sala de aula.

À professora Elisa Yoko Hirooka e ao professor Ernst Echehardt Müffer, pelas valiosas sugestões no exame de qualificação.

Aos técnicos, aos funcionários e aos colegas dos laboratórios do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos — VEL; Bioinseticida — Biologia- VEL e Biotecnologia Vegetal — Embrapa Soja pela colaboração, pelas discussões, sugestões, auxílio, amizade e companheirismos e aos colegas e amigos dos cursos pelo agradável convívio em grupo, cujos nomes não poderei citar, pois são muitos ao longos destes anos.

À Juliane Alves pela ajuda com os experimentos laboratoriais e pela amizade.

À Çiseffe Nobre pela contribuição, pelas longas conversas, discussões e sugestões e, especialmente pelo convívio e amizade.

Aos amigos Fernando Cesar de Macedo Junior e LaurivalAntonio Vilas-Bôas pelo convívio e amizade.

Aos meus queridos pais, João e Berenice, pelo amor incondicional e incentivo constante. Por acreditar que apesar das circunstâncias contrárias, o estudo seria o legado maior que poderia me oferecer. Muito obrigada. Ao meu querido irmão Clésio que mesmo distante, sempre me apoiou, estimulou e esteve sempre presente em meu coração. A minha querida irmã Cláudia que sempre esteve presente. Por trocarmos algumas figurinhas em relação à Microbiologia e pelas incansáveis conversas nos MSNs da vida, sempre me encorajando e dando força. A minha querida irmã Priscila que, às vezes esteve bem perto de mim e às vezes bem distante, mas sempre, me apoiou, incentivou, estimulou e acreditou, mesmo quando me deixou falando sozinha no PC e foi dar uma dormidinha. Ao querido Carlos pelo convívio diário, pelo amor, compreensão, incentivo, encorajamento e companheirismo. À minha sogra Regina Xavier Casaril pela torcida, estímulo e amizade. Amo muito vocês!

Aos amigos Adilson Francelino Alves, Adriana Mantin Ramazotti Alves e Ana Luiza Ramazotti Alves pela amizade e grande apoio durante o período residindo em Londrina, mesmo que distante e pelo apoio na volta a Francisco Beltrão.

Aos amigos Roselaine Navarro B. da Silva e Junior pela amizade, incentivo e receptividade.

A todas as pessoas da minha família (vós, tios, tias, primos e primas), que de alguma forma me ajudaram a chegar até aqui.

A todas as pessoas que, movidas de amor e desprendimento, contribuíram para a realização deste trabalho, fazendo-se presentes sempre que necessárias.

BIOGRAFIA

KERLEY BRAGA PEREIRA BENTO CASARIL, filha de João Ferreira Braga e Berenice Pereira Bento Braga nasceu no Município de Inhapim-MG, no dia 10 de agosto de 1973.

Iniciou os estudos básicos em Novo Horizonte, Município de Inhapim, terminando-os na cidade de Ipatinga-MG.

No ano de 1994 iniciou o curso de graduação em Economia Doméstica na Universidade Federal de Viçosa-MG, graduando-se em 1998.

Em 1999 iniciou o curso de Mestrado em Microbiologia Agrícola na Universidade Federal de Viçosa-MG, concentrando seus estudos na área de Microbiologia dos Processos Fermentativos de Produtos Agroindustriais, submetendo-se a defesa em 31 de agosto de 2001.

Em julho de 2002 ingressou na Universidade Estadual do Oeste do Paraná-PR como Professor Assistente por meio de concurso público.

Em agosto de 2005 iniciou o curso de Doutorado em Ciência de Alimentos na Universidade Estadual de Londrina-PR, submetendo-se a defesa em 25 de junho de 2010.

CASARIL, Kérley Braga Pereira Bento. **Padronização de PCR tradicional e em tempo real para detecção de *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* em alimentos**. 2010. 96 f. Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina. Londrina.

RESUMO

Campylobacter jejuni e *Campylobacter coli* são freqüentemente associadas à campilobacteriose humana, com mais de 80% das infecções causadas por *C. jejuni*. A infecção é esporádica e os surtos são raros. Além de gastroenterite, *C. jejuni* também tem sido associada a doenças auto-imunes pós-infecção, incluindo artrite, síndrome de Guillain-Barré (SGB), síndrome de Miller-Fisher e síndrome de Reiter. Aves e produtos avícolas têm sido implicados como os principais veículos para a infecção por *Campylobacter*. Métodos convencionais de isolamento e de identificação de *Campylobacter* em alimentos geralmente utilizam meios de enriquecimento seletivo com posterior subcultivo em meios sólidos seletivos. Estes métodos são muito demorados e após o isolamento, a identificação fenotípica requer testes bioquímicos e sorológicos adicionais. Os métodos moleculares, como reação em cadeia da polimerase (PCR) têm sido padronizados para detecção, identificação e quantificação de *Campylobacter* spp. em alimentos por serem rápidos, sensíveis e específicos. Os objetivos deste estudo foram desenvolver um ensaio PCR multiplex para detecção e diferenciação entre *C. jejuni* e *C. coli* em carcaças de frango, além disso, quantificar *C. jejuni* em culturas puras e detectar *C. jejuni* em carcaças de frango artificialmente e naturalmente contaminadas, por PCR em tempo real. A PCR multiplex foi desenvolvida utilizando iniciadores *mapA* específico para a detecção de *C. jejuni* e iniciadores *ceuE* específicos para detecção de *C. coli*. A PCR multiplex desenvolvida foi testada em 11 diferentes isolados de *Campylobacter* e 22 espécies não-*Campylobacter* e a especificidade do ensaio padronizado foi de 100%. A PCR multiplex padronizada foi também testada em carcaças de frango contaminadas artificialmente e naturalmente. *Campylobacter* foi detectada a partir da pele de frango artificialmente contaminada com cerca de 50 unidades formadora de colônia (UFC) de *Campylobacter* por 10 g de pele após 48 h de enriquecimento seletivo. Fragmentos específicos de PCR confirmaram a presença de *C. jejuni* (202 pb) e/ou *C. coli* (889 pb) em treze (46,4%) das 28 carcaças de frango adquiridas de supermercados locais de Londrina. Para os ensaios de PCR em tempo real foram utilizados iniciadores *mapA* específico para a detecção de *C. jejuni*. Os testes de especificidade da PCR em tempo real empregando os iniciadores *mapA* para os isolados de *Campylobacter* e isolados de outras espécies bacterianas indicaram que apenas os isolados de *C. jejuni* produziram os produtos de PCR com pico de dissociação de 76,3°C. O limite de detecção da qPCR foi estimado em cerca de uma cópia de DNA por PCR para as culturas puras de *C. jejuni*. O ensaio PCR em tempo real foi testado em carcaças de frango contaminadas artificialmente e naturalmente. *C. jejuni* foi detectada a partir de peles de frango artificialmente contaminadas com aproximadamente 1, 10 ou 50 unidades formadoras de colônia (UFC) de *C. jejuni* por 10 g de pele após 48 h de enriquecimento seletivo. Os produtos de PCR específicos foram observados em todas as amostras analisadas pela PCR em tempo real, após 48 h de enriquecimento seletivo quando o DNA foi extraído por fervura usando Triton X-100. A PCR multiplex e a PCR em tempo real padronizadas mostraram serem métodos rápidos, sensíveis e específicos na detecção de *Campylobacter* em carcaças de frango quando comparado aos métodos convencionais, que exige 5 dias para um resultado negativo e 6-7 dias para confirmar um resultado positivo.

Palavras-chave: *Campylobacter jejuni*. *Campylobacter coli*. PCR em tempo real. PCR multiplex. Carcaças de frango.

CASARIL, Kérley Braga Pereira Bento. **Standardization of PCR traditional and real-time for detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in foods.** 2010. 96 p. Thesis (Doctor in Food Science) - Universidade Estadual de Londrina. Londrina.

ABSTRACT

Campylobacter jejuni and *Campylobacter coli* are frequently associated with human campylobacteriosis, with more than 80% of infections caused by *C. jejuni*. The infection is sporadic and outbreaks are rare. In addition to gastroenteritis, *C. jejuni* has also been associated to autoimmune diseases post-infection including arthritis, Guillain-Barre syndrome (GBS), Miller-Fisher syndrome and Reiter syndrome. Poultry and poultry products have been implicated as the major vehicles for *Campylobacter* infection. Conventional methods for the isolation and identification of *Campylobacter* from food products usually require enrichment culture and subculture on selective agar. These methods are time-consuming and after the isolation, phenotypic identification requires additional biochemical and serological tests. Molecular methods such as polymerase chain reaction (PCR) have been standardized for detection, identification and quantification of *Campylobacter* spp. in foods because they are rapid, sensitive and specific. The objectives of this study were to develop a multiplex PCR for detection and differentiation between *C. jejuni* and *C. coli* in chicken carcasses; moreover, quantify *C. jejuni* in pure cultures and detect *C. jejuni* with spiked and naturally contaminated chicken carcasses by real time PCR. The multiplex PCR was developed using *mapA* primers specific for detection of *C. jejuni* and *ceuE* primers specific for detection of *C. coli*. The multiplex PCR developed was tested on 11 different isolates of *Campylobacter* and on 22 *non-Campylobacter* species and specificity of the assay standardized was 100%. The PCR assay was tested with spiked and naturally contaminated chicken carcasses. *Campylobacter* was detected from chicken skin spiked contaminated with approximately 50 colony forming unit. (CFU) of *Campylobacter* per 10-g after 48 h of selective enrichment. Specific DNA fragments of the PCR confirmed the presence of *C. jejuni* (202-bp) and or *C. coli* (889-pb) from thirteen (46.4%) out of 28 analyzed chicken carcasses purchased from local retail market, in Londrina. For real-time PCR assays were used *mapA* primers specific for detection of *C. jejuni*. Tests for specificity of real-time PCR using the gene *mapA* for isolates of *Campylobacter* and other bacterial genera showed that only isolates of *C. jejuni* produced PCR products with a peak separation of 76.3 ° C. The limit detection of qPCR was estimated at about one copy of DNA by PCR for pure cultures of *C. jejuni*. The real-time PCR assay was tested with spiked and naturally contaminated chicken carcasses. *C. jejuni* was detected from chicken skin spiked with approximately 1, 10 or 50 colony forming unit (CFU) of *C. jejuni* per 10-g of skin after 48 h of selective enrichment. Specific PCR products were observed in all samples analyzed by the real-time PCR after 48 h of selective enrichment when DNA was extracted by boiling using Triton X-100. The PCR multiplex and real-time PCR methods have shown to be rapid, sensitive and specific on the detection of *Campylobacter* in chicken carcasses, when compared with conventional methods that requires 5 days for a negative result and 6-7 days to confirm a positive result.

Keywords: *Campylobacter jejuni*. *Campylobacter coli*. Real-time PCR. Multiplex PCR. Chicken carcasses.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1	Caracterização do Gênero <i>Campylobacter</i>	14
2.2	Campilobacteriose	16
2.3	Síndrome de Guillain Barré.....	19
2.4	Principais Meios de Cultura e de Identificação Bioquímica Empregados na Detecção de <i>Campylobacter</i> em Alimentos	20
2.5	Métodos Moleculares de Detecção de <i>Campylobacter</i> em Alimentos.....	23
2.5.1	PCR em Tempo Real.....	25
2.5.2	PCR Multiplex.....	27
	REFERÊNCIAS	30
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
3.1	ARTIGO 1: Multiplex Polymerase Chain Reaction (PCR) Assay for Detection and Differentiation of <i>Campylobacter jejuni</i> and <i>Campylobacter coli</i> in Chicken Carcasses.....	42
3.2	ARTIGO 2: Padronização de PCR em Tempo Real para Quantificação de <i>ampylobacter jejuni</i>	61
3.3	ARTIGO 3: Detecção de <i>Campylobacter jejuni</i> em Carcaças de Frango por PCR em Tempo Real.....	79
4	CONCLUSÕES	96

1. INTRODUÇÃO

Espécies de *Campylobacter* termofílicas têm sido identificadas como a maior causa de gastroenterite bacteriana em humanos em vários países (ALTEKRUSE et al., 1999; FRIEDMAN et al., 2000; HOUNG et al., 2001).

A maioria das infecções é esporádica (COWDEN, 1992) e os surtos são raros (PEBODY et al., 1997). O Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) dos Estados Unidos calcula que ocorrem 13 casos de campilobacteriose para cada 100.000 habitantes. Segundo o CDC, muitos casos não são reportados e estima-se que campilobacteriose afete mais de 2,4 milhões de pessoas a cada ano, ou 0,8% da população. Embora comumente não cause morte, cerca de 124 óbitos ocorrem a cada ano por infecções causadas por *Campylobacter* (CDC, 2010).

No Brasil, a presença de *Campylobacter* spp. tem sido relatada em casos de diarreia aguda ou crônica e em indivíduos assintomáticos. Segundo Scarcelli et al. (2005), *Campylobacter* spp. foi o segundo patógeno mais isolado de crianças com idade inferior a quatro anos, no período de janeiro de 1998 e abril de 2001, correspondendo a aproximadamente 25,9% dos quadros diarréicos diagnosticados no Laboratório de Análises Clínicas Fleury, São Paulo.

Campilobacteriose tem sido associada a doenças auto-imunes pós-infecção incluindo, artrite, síndrome de Guillain-Barré (SGB), síndrome de Miller Fisher e síndrome de Reiter (SNELLING et al., 2005).

As aves, especialmente frangos, são os principais reservatórios naturais de *Campylobacter* (JONES et al., 1984; WORKMAN et al., 2005). O consumo e a manipulação de aves e produtos avícolas têm sido implicados como os principais veículos de infecção (O'SULLIVAN et al., 2000; JORGENSEN et al., 2002; MEAD, 2004; HUSSAIN et al., 2007). A prevalência de *Campylobacter* em produtos avícolas é elevada (UYTTENDALE et al., 1999, ZHAO et al., 2001; JORGENSEN et al., 2002). Em um estudo recente realizado em Londrina, Paraná, Brasil, 93,3% das carcaças de frango examinadas estavam contaminadas por *Campylobacter* spp. e 50% das amostras frescas examinadas após o enriquecimento foram positivas para *C. jejuni* (MAZIERO e OLIVEIRA, 2010).

Campylobacter spp. raramente são isoladas de carnes vermelhas como as de origem bovina ou suína (KRAMER et al., 2000). Porém, o leite contaminado (HEUVELINK et al., 2009) e a água não tratada têm sido responsáveis por grandes surtos de campilobacteriose (JONES e ROWORTH, 1996).

No cenário mundial, o Brasil é o terceiro produtor e, atualmente, é o maior exportador mundial de carne de frango. Em 2008, o país exportou 3,4 milhões de toneladas de carne de frango. A venda gerou uma receita de US\$ 6,3 bilhões ao agronegócio brasileiro. O mercado de exportação continua crescendo e a sua influência é observada em todos os níveis da produção avícola brasileira (IBGE, 2009).

O Estado do Paraná é uma das áreas agrícolas mais produtivas do país, ocupando uma posição estratégica no Mercosul, além de ser o maior produtor brasileiro de frangos. Dados divulgados pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2009) destacam que no primeiro trimestre de 2009 foram abatidos no Brasil 1,168 bilhões de unidades de frangos, sendo 26,5% deste total no Paraná.

Como *Campylobacter* faz parte da microbiota normal intestinal de animais domésticos, em especial das aves, o monitoramento destas bactérias é muito importante para o controle da doença humana. Embora o Brasil seja um grande exportador de carne de frango, existe pouca informação sobre a contaminação deste produto por esta bactéria.

No Paraná, o Laboratório Geral do Estado (LACEN) dá suporte à Vigilância Sanitária e Epidemiológica de Alimentos na elucidação de surtos de origem alimentar. Porém, como esta doença raramente ocorre na forma de grandes surtos, é essencial a preocupação com o monitoramento de alimentos e amostras ambientais contaminados e com o diagnóstico laboratorial utilizando material biológico humano, para que a incidência e a prevalência desta doença não continuem desconhecidas.

Além da saúde dos consumidores, o monitoramento da contaminação de alimentos, em especial da carne de aves, tem uma importância fundamental para o controle de qualidade higiênico-sanitário. O potencial cada vez maior do Brasil na exportação de alimentos torna essencial a preocupação com barreiras sanitárias, que serão sem dúvida o grande impedimento da comercialização em um mundo globalizado.

Os métodos convencionais de isolamento de *Campylobacter* em alimentos, água ou amostras ambientais utilizam meios de enriquecimento seletivo com posterior subcultivo em meios sólidos seletivos. Estes métodos são muito demorados e após o isolamento, a identificação fenotípica requer testes bioquímicos e sorológicos adicionais (CORRY et al., 1995). Além disso, esse tempo longo de análise limita o uso no controle de qualidade de alimentos perecíveis.

Essas limitações, associadas ao fato de *Campylobacter* não ser pesquisado de rotina em pacientes com gastroenterite nos laboratórios clínicos brasileiros, fazem com que as autoridades sanitárias desconheçam a prevalência de contaminação dos produtos alimentícios por esta bactéria, como também, a incidência da doença no país.

Devido à rapidez, especificidade e sensibilidade, os métodos moleculares, como a reação em cadeia da polimerase (PCR), têm sido padronizados para detecção, identificação e quantificação de *Campylobacter* em alimentos (CHENG e GRIFFITHS, 2003; OLIVEIRA et al., 2005ab).

Porém, a transferência de métodos padronizados em laboratórios de pesquisa, para laboratórios de rotina, principalmente a PCR tradicional, tem sido muito lenta. Esse fato pode ser explicado em parte pela utilização de gel de eletroforese para a detecção dos produtos amplificados e a interpretação subjetiva dos resultados.

Assim, os métodos que empregam a reação de amplificação em tempo real têm sido padronizados. O uso do corante fluorescente SYBR Green, que se liga ao DNA de dupla fita, permite a detecção de produtos amplificados na PCR sem o uso de sondas marcadas. Além disso, podem ser usados os iniciadores e também as condições de amplificação empregadas na PCR tradicional com pequenas modificações (AARTS et al., 2001; KAISER et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2005a).

Assim, o presente estudo teve por objetivos desenvolver uma PCR multiplex convencional para detecção e diferenciação simultânea de *C. jejuni* e *C. coli* em culturas puras e em carcaças de frango, artificialmente e naturalmente contaminadas. Além disso, detectar e quantificar *C. jejuni* em culturas puras e em carcaças de frango, artificialmente e naturalmente contaminadas, por PCR em tempo real.

E como objetivos específicos:

- Definir os pares de iniciadores e as melhores condições de amplificação de DNA a serem utilizadas na padronização de PCR multiplex convencional para detecção de *C. jejuni* e *C. coli* em culturas puras.
- Padronizar PCR multiplex convencional para detecção simultânea de *C. jejuni* e *C. coli* em culturas puras.
- Testar o ensaio PCR multiplex padronizado para a detecção simultânea de *C. jejuni* e *C. coli* em carcaças de frango artificialmente e naturalmente contaminadas.
- Definir os pares de iniciadores e as melhores condições de amplificação de DNA a serem utilizadas na padronização de PCR em tempo real para detecção de *C. jejuni* em culturas puras.
- Padronizar PCR em tempo real para detecção e quantificação de *C. jejuni* em culturas puras.
- Testar o ensaio PCR em tempo real padronizado para a detecção de *C. jejuni* em carcaças de frango artificialmente e naturalmente contaminadas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

40" Ectcevgtk c± q"fq"l ´pgtq'Eco r {mqdcevgt"

As espécies do gênero *Campylobacter* pertencem à família Campylobacteriaceae. São bacilos Gram-negativos muito pequenos (0,2-0,8 µm de largura e 0,5-5 µm de comprimento), curvos ou espiralados, não formadores de esporos, não hemolíticos. Apresentam motilidade, devido à presença de flagelos monotríquios em uma ou ambas as extremidades. Os flagelos podem medir até três vezes o comprimento da célula e são responsáveis pelo movimento característico de “saca-rolha” ou “vaivém” (VANDAMME, 2000; BUTZLER, 2004).

Em culturas jovens as células apresentam-se em forma de asa de gaivota, que passam à morfologia cocóide em culturas de vários dias, correspondente à forma não cultivável (HAZELEGER et al., 1994). Espécies de *Campylobacter* são microaerófilas tendo seu crescimento inibido em concentrações de oxigênio menor que 3% e maior que 15%. São capnofílicas, ou seja, não crescem na ausência de dióxido de carbono e requerem cerca de 10% de CO₂ para multiplicarem-se (BUTZLER, 1984; KETLEY, 1997).

São organismos quimiorganotróficos e apresentam metabolismo respiratório aeróbico ou anaeróbico. Não fermentam glicose e nem oxidam açúcares, obtendo energia a partir de aminoácidos ou de intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico (BUTZLER, 1984, JONES et al., 1993). São oxidase positivos (VANDAMME, 2000).

O gênero *Campylobacter* pode ser separado em dois grupos quanto à presença de catalase. *C. jejuni*, *C. fetus*, *C. faecalis* e *C. coli*, que são as espécies mais importantes do ponto de vista patogênico, pertencem ao grupo *Campylobacter* catalase-positiva. Espécies, tais como, *C. sputorum* e *C. concisus* formam o grupo *Campylobacter* catalase-negativa, que são mais sensíveis ao oxigênio e, ao contrário do grupo catalase-positivo reduzem nitrato a nitrito (BUTZLER, 1984).

Atualmente, o gênero *Campylobacter* compreende 20 espécies e subespécies (VANDAMME et al., 2005). *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* e *C. upsaliensis* representam o grupo de bactérias denominadas termofílicas (FERMÉR e ENGVALL, 1999), que multiplicam em faixas de temperaturas entre 30 a 45° C, com um ótimo de 42° C (PARK, 2002), enquanto a morte celular ocorre entre 56 e 57 °C (NGUYEN et al., 2006). Apesar de sua natureza termofílica, a temperatura do corpo humano parece ser a ideal para o crescimento e quimiotáxia de *Campylobacter* (KHANNA et al., 2006),

As espécies *C. jejuni* subsp. *jejuni*, *C. coli*, *C. fetus* subsp. *fetus*, *C. upsaliensis*, *C. hyointestinalis*, *C. jejuni* subsp. *doylei*, *C. lari* e *C. concisus* já foram associadas a gastroenterites em humanos, porém *C. jejuni* subsp. *jejuni* é a espécie mais comumente isolada desses casos, seguida de *C. coli* (LASTOVICA e SKIRROW, 2000; NACHAMKIN, 2001; BUTZLER, 2004).

Se comparados a outros patógenos de origem alimentar, *Campylobacter* spp. são altamente susceptíveis a inúmeras condições ambientais e, geralmente menos tolerantes a estresses ambientais (PARK, 2002). *Campylobacter* spp. são muito sensíveis à dessecação e, conseqüentemente, não sobrevivem bem em superfícies secas (FERNANDEZ et al., 1985) e à presença de NaCl, sendo essa sensibilidade variável em função da temperatura (DOYLE e ROMAN, 1982). Além disso, não sobrevivem bem à exposição aos raios ultravioletas (OBIRI-DANSO et al., 2001), à pressão hidrostática (SOLOMON e HOOVER, 2004), bem como, a valores baixos de pH entre 2,5 a 4,5 do microambiente (WATERMAN e SMALL, 1998).

Apesar de serem termofílicas em seus requisitos de crescimento, *C. jejuni* e *C. coli* não resistem a altas temperaturas e, conseqüentemente, não sobrevivem no alimento que foi pasteurizado ou cozido adequadamente (PARK, 2002).

A capacidade de *Campylobacter* sobreviver nos alimentos e causar um grande número de doenças, apesar da sua natureza fastidiosa e sensibilidade aos níveis de oxigênio encontrados no ambiente é, extremamente instigante e tem levado muitos pesquisadores a investigar a capacidade de *C. jejuni* formar biofilmes (TRACHOO et al., 2002; LEHTOLA et al., 2006; JOSHUA et al., 2006; GUNTHER e CHEN, 2008).

40 "Eco r kmdcevgtkqug"

Theodor Escherich, em 1886, foi o primeiro pesquisador a descrever *Campylobacter*. Ele publicou uma série de artigos descrevendo uma bactéria espiralada proveniente do cólon de crianças que haviam morrido do que foi chamado de “*Cholera infantum*” (BUTZLER, 2004). Várias tentativas no sentido de cultivar esse organismo em meios sólidos foram fracassadas.

Em 1913, McFadyean e Stockman identificaram *Campylobacter* (originalmente classificado como *Vibrio*) associado a casos de abortos em ovinos. Em 1957, King descreveu o isolamento de um vibrio, possivelmente *Campylobacter* de amostras de sangue de crianças com diarreia. Em 1972, Dekeyser e colaboradores isolaram pela primeira vez a bactéria *Campylobacter* spp. de amostras de fezes de pacientes com diarreia (ALTEKRUSE, 1999).

A maioria das pessoas com campilobacteriose apresenta diarreia, cólicas, dor abdominal e febre, sintomas que podem durar de dois a cinco dias após a exposição ao microrganismo. Em muitos casos, a diarreia pode ser sanguinolenta e estar acompanhada por náuseas e vômitos (BLASER et al., 1983, CDC, 2010). A doença normalmente dura uma semana. Muitas pessoas infectadas com *Campylobacter* não apresentam sintomas da doença. No entanto, em indivíduos com o sistema imune comprometido, pode ocorrer bacteremia e sérios agravos à saúde (CDC, 2010).

Campilobacteriose tem sido associada a doenças auto-imunes pós-infecção incluindo artrite, síndrome de Guillain-Barré (SGB), síndrome de Miller-Fisher e síndrome de Reiter (SALLOWAY et al., 1996; ALTEKRUSE et al., 1998; THOMAS et al., 1999; HONG et al., 2004; SNELLING et al., 2005).

Os mecanismos de virulência envolvidos na campilobacteriose ainda são pouco compreendidos. Os fatores potenciais de virulência incluem quimiotaxia, motilidade, capacidade de aderência e colonização das células intestinais, invasão e translocação epitelial, sobrevivência intracelular e produção de toxinas (KETLEY, 1997).

A dose infectante é muito pequena; estima-se que cerca de 500 células de *C. jejuni* podem causar doenças em humanos (ROLLINS e COLWELL, 1986; BLACK et al., 1998), indicando que mesmo um pequeno número dessas bactérias em alimentos ou em água pode apresentar potencial risco à saúde.

Nos Estados Unidos, a infecção por *Campylobacter* é a causa mais comum de diarreia bacteriana. A estimativa anual é de 13 casos para 100.000 habitantes, porém segundo o CDC este número pode ser muito maior, pois os casos em sua maioria não são diagnosticados ou reportados. Estima-se que campilobacteriose afeta mais de 2,4 milhões de pessoas a cada ano, ou seja, 0,8% da população. Embora as infecções por *Campylobacter* sejam autolimitadas, estima-se aproximadamente 124 óbitos por ano (CDC, 2010).

Praticamente todos os casos ocorrem como eventos isolados e esporádicos (COWDEN, 1992; PEBODY et al., 1997). Os surtos são infrequentes (PEBODY et al., 1997), porém leite não pasteurizado (FAHEY et al., 1995; HEUVELINK et al., 2009) e água não tratada (BLASER et al., 1983; JONES e ROWORTH, 1996) têm sido responsáveis por grandes surtos de campilobacteriose, bem como, carnes cruas ou mal cozidas, hambúrgueres, salsichas e moluscos contaminados (BUTZLER, 2004).

As aves, especialmente frangos, são os principais reservatórios naturais de *Campylobacter*. Embora evidências epidemiológicas sugiram que outros animais, tais como, aves silvestres, suínos, cães, gatos, ovelhas, bovinos (SKIRROW, 1991; STERN, 1992; JONES et al., 1984; WORKMAN et al., 2005), tartarugas (HARVEY e GREENWOOD, 1985), *hamsters* (FOX et al., 1983) e macacos (TRESIERRA-AYALA e FERNANDEZ, 1997) possam ser portadores de estirpes patogênicas para os seres humanos.

Estudos microbiológicos analisando aves domésticas compradas em estabelecimentos de varejo nos Estados Unidos e no Reino Unido mostraram que 68 a 83% das aves estavam contaminadas com *Campylobacter* spp. (HARRISON et al., 2001; ZHAO et al., 2001; JORGENSEN et al., 2002).

O trato intestinal de frangos frequentemente contém *Campylobacter* e a contaminação cruzada durante o transporte e o processamento de frangos, com alta contagem bacteriana intestinal pode resultar em carcaças contaminadas (RÖNNER e LINDMARK, 2007).

A prevalência de *Campylobacter* em produtos avícolas é elevada (UYTTENDALE et al., 1999, ZHAO et al., 2001; JORGENSEN et al., 2002). Em um estudo recente realizado em Londrina, Paraná, Brasil, 93,3% das carcaças de frango examinadas estavam contaminadas por *Campylobacter* spp. e 50% das amostras frescas examinadas após o enriquecimento foram positivas para *C. jejuni* (MAZIERO e OLIVEIRA, 2010).

Franchin et al. (2005) estudaram em um sistema de integração de aves no sul do Brasil as possíveis fontes de contaminação por *Campylobacter* termofílicas de carne de frango antes do abate. *Campylobacter* termofílica foi encontrado em 22 dos 24 lotes de aves destinados ao abate, o que significa 91,7% dos lotes analisados. *Campylobacter* foi encontrada em 79,2% das amostras de penas, seguidos de esfregaços de cloaca (75,0%).

As formas mais frequentes de transmissão de *Campylobacter* ao ser humano são a manipulação de aves e carnes de aves cruas e o consumo dessas carnes cruas ou mal cozidas (TAUXE et al., 1985; GONZALEZ et al., 1997; FRIEDMAN et al., 2004).

Tosin e Machado (1995) estudaram a ocorrência de *Campylobacter* spp. em fezes de manipuladores de alimentos em cozinhas hospitalares e institucionais de Florianópolis, Santa Catarina e constaram que 6,2% dos 177 manipuladores analisados eram portadores assintomáticos. Os índices de contaminação foram de 10,5% e 2,2% dos manipuladores assintomáticos de cozinhas institucionais e de cozinhas hospitalares, respectivamente.

45"Ujpf tqo g"fg"l wkmkp"Dctt²"

Síndrome de Guillain Barré (SGB) é uma desordem auto-imune do sistema nervoso periférico, caracterizada por fraqueza, geralmente simétrica, evoluindo ao longo de vários dias (NACHAMKIN et al., 1998). Caracteriza-se por destruição pelo sistema imunológico da bainha de mielina que envolve os nervos periféricos levando à paralisia e, frequentemente à necessidade de terapia intensiva por várias semanas (BLASER, 1997; ALLOS et al., 1998; CDC, 2010).

A doença ocorre em todas as partes do mundo, em qualquer época do ano, afetando adultos e crianças, homens e mulheres, independente da classe social e dos hábitos de vida (ADAMS e VICTOR, 1989). Parece ser mais freqüente com o avançar da idade e é ligeiramente mais comum em homens (HADDEN e HUGHES, 1998, CDC, 2010).

Embora os fatores que desencadeiam a síndrome de Guillain Barré ainda sejam desconhecidos, cerca de 2/3 dos pacientes apresentam infecção entre uma a três semanas antes do início dos sintomas (COLLE et al., 2002). Na maioria dos casos, as infecções são bacterianas ou virais. Os agentes associados à SGB além de *Campylobacter jejuni* são *Mycoplasma pneumoniae*, citomegalovirus, vírus Epstein-Barr e vírus varicela-zoster (HUGHES e REES, 1997).

Rhodes e Tattersfield (1982) foram os primeiros a relatar o desenvolvimento da SGB em paciente após 10 dias da infecção por *C. jejuni*. As infecções causadas por *Campylobacter jejuni* têm emergido como um dos eventos antecedentes mais comuns associados à Síndrome de Guillain Barré (MISHU et al., 1993; KUROKI et al., 1993; REES et al., 1995).

A síndrome quando associada a *Campylobacter* aparece entre 10 dias a três semanas após o início da diarreia (ALLOS, 1997). Quando os sintomas neurológicos iniciam, até 40% dos pacientes com SGB têm cultura ou evidências sorológicas de infecção por *C. jejuni* (MISHU et al., 1993; KUROKI et al., 1993; REES et al., 1995, CDC, 2010). Nos Estados Unidos estima-se que 1 em cada 1.058 casos de campilobacteriose sejam seguidos por SGB. O risco de desenvolvimento de SGB pode

ser maior dependendo do sorogrupo de *Campylobacter jejuni*. A estimativa de ocorrência de SGB é de 1 para 158 casos quando a infecção é causada pelo O:19 (ALLOS, 1997).

O tempo médio de excreção de *C. jejuni* nas fezes é de 16 dias (SVEDHEM e KAIJSER, 1980), enquanto anticorpos contra *C. jejuni* podem permanecer elevados por várias semanas após infecção aguda (BLASER e DUNCAN, 1984).

Além de SBG, *C. jejuni* também tem sido associada a outras doenças auto-imunes pós-infecção incluindo, artrite, síndrome de Miller Fisher e síndrome de Reiter (SNELLING et al., 2005).

46 "Rt kpek rcku" O gkqu" f g" Ew wwtc" g" f g" K g p v h e c ± q " Dk q s w f b k e c " G o r t g i c f q u " p c "

F g v g e ± q " f g " E c o r { m d c e v g t " g o " C r k o g p v q u "

Análises de alimentos *in natura* para detecção de microrganismos patogênicos específicos apresentam vários problemas. Um deles está relacionado ao número de microrganismos presentes. Quando bactérias patogênicas estão presentes em um alimento, estão frequentemente em números baixos, com distribuição heterogênea, necessitando da análise de um grande número de amostras para que haja confiabilidade nos resultados negativos (CASON et al., 1997).

Os métodos de cultura utilizados para o isolamento, a identificação e a diferenciação entre as espécies de *Campylobacter* são demorados e difíceis devido a sua natureza fastidiosa (PENNER, 1988; ON e HOLMES, 1992; SANDERS, 1998). A precisão de alguns testes bioquímicos também é afetada pelo tamanho do inóculo bacteriano (ON e HOLMES, 1991), que pode ser difícil de controlar.

Os métodos de detecção usualmente incluem passos de pré-enriquecimento, enriquecimento e plaqueamento em ágar seletivo, seguido de identificação bioquímica. Incubação prolongada e procedimentos de enriquecimento seletivo para reduzir a multiplicação da microbiota indesejável requer quatro dias para produzir um resultado negativo e 6 a 7 dias para confirmar um resultado positivo (GIESENDORF e QUINT, 1995; YANG-CHIH SHIH, 2000).

Campylobacter geralmente está presente em números muito baixos e pode tornar-se injuriado em alimentos e água. Portanto, entrar em um estado viável, mas não cultivável devido à diminuição de nutrientes e do estresse físico (HUMPHREY, 1986; ROLLINS e COLWELL, 1986; JONES et al., 1991; BEUMER et al., 1992; MEDEMA et al., 1992), pode explicar a falha das técnicas de cultura para isolar os microrganismos de água e alimentos envolvidos em casos e em surtos de infecções (ROLLINS e COLWELL, 1986; JONES et al., 1991).

Não existe um consenso quanto ao melhor método de isolamento de *Campylobacter* spp. Uma variedade de meios de enriquecimento e cultura tem sido proposta para o isolamento de espécies de *Campylobacter* (PARK et al., 1984).

Vários meios de enriquecimento foram descritos e os utilizados com maior frequência são caldo Preston (BOLTON e ROBERTSON, 1982), caldo Exeter (MARTIN et al., 1996), caldo Bolton, caldo CEB (*Campylobacter* enrichment broth) e caldo Park e Sanders. O caldo Bolton, um dos meios de enriquecimento sem a adição de sangue mais utilizados contém sulfato ferroso, metabissulfito de sódio, piruvato de sódio e hemina (CORRY et al., 1995), proporcionando proteção contra produtos tóxicos derivados de oxigênio.

Meios seletivos para *Campylobacter* termofílico contêm várias combinações de antibióticos e/ou agentes antimicrobianos para inibir a microbiota competitiva. Os antimicrobianos mais utilizados como inibidores da microbiota são: vancomicina, polimixina B, trimetoprim e cefalosporinas. Outros agentes, tais como sangue e carvão são adicionados às formulações para proteger *Campylobacter* spp. contra os derivados tóxicos do oxigênio. Incubação a 42° C serve como um critério adicional de seletividade de espécies termotolerantes (CORRY et al., 1995; ICMSF, 1996; JACOBS-REITSMA, 2000).

Em 1973, Butzler e colaboradores propuseram a utilização de um meio seletivo para o isolamento de *Campylobacter* spp. a partir do filtrado do material fecal, contendo bacitracina, polimixina B, novobiocina e actidione, que inibem as bactérias intestinais, permitindo o crescimento de *C. jejuni*. Este meio é conhecido como meio de Butzler (BUTZLER, 1973).

Em 1977, Skirrow propôs uma nova metodologia para o isolamento de *C. jejuni* em meio seletivo contendo vancomicina, polimixina B e trimetoprim, que permitia o desenvolvimento desses patógenos sem a necessidade da prévia filtração das fezes (SKIRROW, 1977).

Blaser et al. (1979) descreveram uma nova mistura de antimicrobianos contendo vancomicina, trimetoprim, polimixina B, anfotericina B e cefalotina. A introdução dos meios de cultivo seletivos tornou o isolamento de *Campylobacter* um procedimento mais simples (ALTEKRUSE, 1999) e *C. jejuni* tornou-se rapidamente a causa mais diagnosticada de gastroenterites em seres humanos em vários países (TAUXE, 1992).

Line (2001) avaliou diferentes formulações de antibióticos para a recuperação de *Campylobacter*. Os melhores resultados foram obtidos com a combinação de cefoperazona, cicloheximida, vancomicina, trimetoprim e polimixina B. Esse mesmo autor também comprovou que a adição de 200 mg/L de cloreto de trifeniltetrazólio (TTC) facilita a visualização e contagem das colônias.

Os meios seletivos mais empregados no momento para o cultivo de *Campylobacter* incluem: meio de Skirrow (SKIRROW, 1977), meio de Preston (HUTCHINSON e BOLTON, 1983), meio seletivo com carvão ativado (CSM) (HUTCHINSON e BOLTON, 1984), ágar desoxicolato cefoperazona (CCDA) (KARMALI et al., 1986) e meio motilidade semi-sólido sem sangue (SSM) (GOOSSENS et al., 1990).

Várias provas bioquímicas são usadas para diferenciar as espécies, como a produção de oxidase, catalase, sulfeto de hidrogênio, hidrólise do hipurato, redução de nitrato e sensibilidade a cefalotina e ácido nalidíxico (BARRETT et al., 1988). O uso dos antibióticos para diferenciação de espécies tem sido problemático devido à resistência de algumas cepas (ENDTZ et al., 1991).

A distinção entre espécies relacionadas tais como, *C. jejuni* e *C. coli* está baseada no teste da hidrólise do hipurato de sódio (BARRETT et al., 1988). Entretanto, a diferenciação entre as duas espécies baseada somente nesse teste pode trazer problemas, uma vez que, essa distinção fenotípica não é sempre precisa

(TOTTEN et al., 1987; NICHOLSON e PATTON, 1993) e sua interpretação pode ser subjetiva, conduzindo a identificação errônea (ON e HOLMES, 1991).

407"O 2 vqf qu'O qrgewrctgu'f g'F gve± q'f g'Eco r {mqdcevgt"go 'Crik gpvqu"

Um método rápido, sensível e específico para detectar *Campylobacter* viável em substratos complexos como alimentos e amostras ambientais é essencial para auxiliar no entendimento da epidemiologia da infecção. Além disso, possibilitará o rastreamento de *C. jejuni* na cadeia alimentar, o que facilitaria o planejamento e a implementação de medidas de intervenção eficazes (CHENG e GRIFFITHS, 2003).

A PCR tem provado ser uma técnica altamente sensível, específica e rápida para detectar bactérias em culturas puras e em reservatórios naturais. É um método que tem sido amplamente utilizada na detecção de *Campylobacter* em diversos substratos. Esse método é baseado na amplificação de uma seqüência alvo de DNA específica e análise do produto de amplificação (MULLIS e FALOONA, 1987).

Várias técnicas de PCR para a detecção de *Campylobacter* já foram desenvolvidas. Estas técnicas incluem PCR convencional (WINTERS e SLAVIK, 1995; NG et al., 1997; KONKEL et al., 1999; NOGVA et al., 2000; O'SULLIVAN et al., 2000; MORENO et al., 2001), *PCR nested ou seminested* (WAAGE et al., 1999), PCR multiplex (DENIS et al., 1999; WINTERS e SLAVIK, 2000; KOROLIK et al., 2001), RT-PCR (SAILS et al., 1998), PCR-ELISA -*PCR enzyme-linked immunosorbent assay* (GRENNAN et al., 2001; LILJA e HANNINEN, 2001; SAILS et al., 2001) e PCR em tempo real (LOGAN et al., 2001, CHENG e GRIFFITHS, 2003; OLIVEIRA et al., 2005ab).

A técnica de PCR é uma grande aliada na identificação de bactérias cujo isolamento e identificação são difíceis. A rapidez, um bom limite de detecção, especificidade e sensibilidade são vantagens da PCR, que tornam a técnica uma eficiente alternativa aos métodos tradicionais de diagnóstico (MALORNY et al., 2003). A PCR convencional utiliza eletroforese em gel de agarose para detecção do

produto de amplificação, porém a eletroforese em gel de agarose é demorada, carece de sensibilidade e especificidade e pode ser subjetiva em sua interpretação.

Iniciadores ou sondas específicas para *Campylobacter* spp. foram usados em várias técnicas de PCR para detectar *Campylobacter* em aves domésticas (GIESENDORF et al., 1992; ITOH et al., 1995), fezes (WAEGEL e NACHAMKIN, 1999), leite cru (WEGMULLER et al., 1993; ALLMANN et al., 1995; JACKSON et al., 1996), amostras de esgoto e de água (BEJ et al., 1990; HERNANDEZ et al., 1995). Vários genes já foram empregados para o desenho de oligonucleotídeos iniciadores que amplificam sequências alvo-específicas e possibilitam a detecção e a distinção de *Campylobacter*, conforme apresentado na tabela 1.

Tabela 1- Genes alvos testados para a detecção e a distinção de *Campylobacter* spp.

Gene Alvo	Fonte	Referência
<i>flaA</i>	Água ambiental	Oyofe e Rollins, 1993
	Fezes humanas	Waegel e Nachamnin, 1996
<i>rRNA 16S</i>	Produtos à base de frango	Giesendorf e Quint, 1992
	Fezes humanas	Lawson et al., 1999
	Fezes humanas	Metherell et al., 1999
	Amostras clínicas	Vanniasinkam et al., 1999
	Fezes de galinha	Lund et al., 2004
<i>rRNA 23S</i>	Amostras clínicas	Eyers et al., 1993
	Culturas de <i>Campylobacter</i> spp.	Fermér e Engvall, 1999
<i>ceuE</i>	Culturas de <i>Campylobacter</i> spp.	Gonzalez et al., 1997
	Cama de peru, amostras de fígado de frango e amostras clínicas	Nayak et al., 2005
	Fezes humanas	Houng et al., 2001
	Culturas bacterianas	Best et al., 2003
<i>mapA</i>	Amostras clínicas de humanos, cachorros, gatos, bezerros e galinhas	Stucki et al., 1995
	Culturas bacterianas	Best et al., 2003
	Água de rinsagem de frango artificialmente contaminada com <i>C. jejuni</i>	Cheng e Griffiths, 2003
	Águas superficiais	Ahmed et al., 2009
<i>cadF</i>	Água de rinsagem de frango artificialmente contaminada com <i>C. jejuni</i>	Cheng e Griffiths, 2003
	Pele de frango, carne de porco e leite artificialmente contaminados.	Oliveira et al., 2005a
	Carcaças de frango	Oliveira et al., 2005b
<i>gyrA</i>	Fezes de galinha	Rasmussen et al., 1996
<i>glyA</i>	Amostras clínicas	LaGier et al., 2004
<i>hipO</i>	Carcaças de frango contaminadas artificialmente com <i>C. jejuni</i>	Englen e Kelley, 2000
	Amostras clínicas	LaGier et al., 2004
<i>cdt</i>	Carcaças de frango frescas	Eyigor et al., 1999
	Amostras clínicas de humanos e de animais.	Eyigor et al., 1999
<i>VSI</i>	Culturas bacterianas	Yang et al., 2004
	Água de rinsagem de planta de processamento de frangos	Debretson et al., 2007

408" RET"go "Vgo r q" Tgcn'

Entre as várias estratégias de PCR disponíveis, aquelas baseadas no monitoramento da reação de amplificação em tempo real são provavelmente as mais promissoras.

A PCR em tempo real monitora a reação ciclo a ciclo, associando a amplificação do alvo em cada ciclo com a emissão de uma determinada quantidade de fluorescência. A fluorescência é originada durante a hibridação do DNA alvo com sondas ou iniciadores marcados com fluoróforos específicos. A intensidade de sinal emitida é proporcional à quantidade de DNA alvo amplificado e aumenta exponencialmente em cada ciclo de amplificação. Deste modo, é possível monitorar a quantidade de produto gerada em cada ciclo, durante a fase exponencial da reação, onde a quantidade de fragmento gerado é proporcional à quantidade inicial (MARCELINO, 2006).

Inúmeras metodologias para detecção, identificação e quantificação de *Campylobacter* baseadas em PCR em tempo real vêm sendo desenvolvidas. Dentre essas metodologias podem ser citadas aquelas baseadas em SYBR Green (CHENG e GRIFFITHS, 2003; OLIVEIRA et al., 2005ab), TaqMan (LIVAK et al., 1995), moléculas beacons (TYAGI e KRAMER, 1996), sondas de hibridação (WITTEWER et al., 1997) e biosondas (LOGAN et al., 2001) que ligam-se com o produto da PCR. Entre as principais tecnologias da PCR em tempo real, os dois sistemas de detecção mais usados são SYBR Green e TaqMan.

No sistema SYBR Green não é necessário o uso de sondas específicas, mas apenas iniciadores específicos que determinam o alvo da amplificação. O SYBR Green é um fluoróforo que se liga ao DNA de dupla fita. Durante os ciclos consecutivos da PCR, a quantidade de DNA de dupla fita se eleva de maneira exponencial, aumentando, assim, a quantidade de SYBR Green ligado e, conseqüentemente, a fluorescência emitida. O SYBR Green tem afinidade por DNA de dupla fita, não havendo nenhum mecanismo de seleção das sequências no qual irá interagir, de modo que qualquer molécula dupla fita amplificada durante a reação contribuirá para o sinal de fluorescência emitida. Dessa forma, ocorrendo amplificações inespecíficas, estas

são detectadas, interferindo na quantificação final dos produtos específicos da reação. Para avaliar a presença de produtos inespecíficos, uma curva de dissociação é construída. Se apenas os produtos específicos foram amplificados, um único pico será visualizado no gráfico de dissociação (VITZTHUM et al., 1999; GRANDO e WAGNER, 2008).

A obtenção da curva de dissociação é realizada aumentando lentamente a temperatura após a amplificação. Com o aumento da temperatura ocorre a separação das fitas de DNA e o corante SYBR Green é liberado e a fluorescência diminui. A fluorescência é monitorada continuamente e os picos de dissociação são obtidos plotando $-d(F)/dT$ versus temperatura (SKEIDSVOLL e UELAND, 1995, OLIVEIRA et al., 2005b). A análise dos picos da curva de dissociação permite a identificação dos produtos amplificados, sem a necessidade subsequente de eletroforese. Esta técnica pode ser usada para identificar sequências amplificadas que possuem cópias únicas do DNA genômico (SKEIDSVOLL e UELAND, 1995).

Entre as vantagens da utilização de SYBR Green estão o baixo custo, facilidade no uso e sensibilidade. A desvantagem é a ligação em todo DNA fita dupla que surge durante a reação, incluindo os dímeros dos iniciadores e outros produtos inespecíficos, podendo superestimar a concentração do fragmento alvo. O SYBR Green não ligado ao DNA exibe uma fluorescência muito pequena, entretanto, a fluorescência é realçada quando ligado na fita dupla do DNA (NOVAIS e PIRES-ALVES, 2004).

A metodologia baseada em TaqMan necessita, além dos iniciadores, de uma sonda que hibrida com a sequência alvo. A sonda possui na extremidade 5' uma molécula fluorescente denominada "*reporter*" e na extremidade 3', outra molécula que pode ou não ser fluorescente (de comprimento de onda diferente), chamada de "*quencher*" (que inibe a fluorescência do "*reporter*") (HOLLAND et al., 1991). Os produtos da reação são detectados pela fluorescência gerada após a atividade exonuclease 5' - 3' da *Taq* DNA polimerase, separando o *quencher* da molécula *reporter* durante a extensão, resultando em um aumento da intensidade da fluorescência. Assim, durante o processo de amplificação a emissão de luz é

aumentada de forma exponencial. Esse aumento da fluorescência ocorre apenas quando a sonda híbrida e a amplificação da sequência alvo é estabelecida (HEID et al., 1996). A reação com a TaqMan é considerada um método sensível para determinar a presença ou ausência de sequências específicas (HOLLAND et al., 1991).

Esta metodologia apresenta um custo elevado, pois a síntese de sondas específicas é necessária. No entanto, este sistema permite sua utilização em reações multiplex, ou seja, reações onde mais de um par de iniciadores pode ser usado, detectando diferentes sequências-alvo.

40704" RET"O wmk rgz"

A PCR multiplex é uma variante da PCR, onde a reação desenhada permite a amplificação simultânea de múltiplas sequências-alvo numa mesma amostra de interesse usando mais de um par de iniciadores (ELNIFRO et al., 2000). A primeira descrição da técnica foi realizada por Chamberlain e colaboradores em 1988. Desde então, a PCR multiplex tem sido aplicada com sucesso em muitas áreas de diagnóstico de ácidos nucleicos incluindo análises de deleções de genes (CHAMBERLAIN et al., 1988; CHAMBERLAIN et al., 1989) análises de mutações e polimorfismos (SHUBER et al., 1993; RITHIDECH et al., 1997) ou em ensaios de qPCR (ZIMMERMANN et al., 1996; SHERLOCK et al., 1998) e rtPCR (ZOU et al., 1988). No campo das doenças infecciosas, a técnica tem se mostrado um método valioso para identificação de vírus, bactérias e outros agentes infecciosos (ELNIFRO et al., 2000).

Tendo em vista que a maioria dos estudos baseados na atividade hidrolítica do hipurato não conseguem distinguir *C. jejuni* de *C. coli*, por causa da relação próxima entre estas duas espécies, o delineamento e a seleção de iniciadores e sondas específicos para *C. jejuni* e *C. coli* fornecerão uma ferramenta importante no estudo da campilobacteriose.

Harmon et al. (1997) desenvolveram PCR multiplex para a identificação e diferenciação de *C. coli* e *C. jejuni* utilizando dois conjuntos de iniciadores, Set I que

amplifica um fragmento de 460-bp presente em *C. coli* e *C. jejuni* e Set II que amplifica um alvo de 160-bp exclusivo para *C. jejuni*.

Gonzalez et al. (1997) propuseram uma PCR multiplex utilizando iniciadores baseados no gene *ceuE* (JEJ1, JEJ2, CC1 e CC2) para detectar e diferenciar *C. jejuni* e *C. coli* e obtiveram fragmentos de DNA de 793-pb e 894-pb, respectivamente. Hounq et al. (2001) verificaram que o iniciador CC1 é uma sequência comum para ambas as espécies e desenharam uma nova mistura de iniciadores para a PCR multiplex contendo iniciadores específicos para detecção e diferenciação de *C. jejuni* e *C. coli* também baseado no gene *ceuE*, obtendo dois produtos de PCR de 645-bp e 783-bp, respectivamente.

Nayak et al. (2005) desenvolvem um ensaio de PCR multiplex para detecção simultânea de *Campylobacter* spp., *C. coli* e *C. jejuni* usando oligonucleotídeos derivados de genes *cadF*, *ceuE* e de um gene de virulência indefinida. Um total de 97 cepas de *Campylobacter* isolados de cama de peru, amostras de fígado de frango e amostras clínicas foram identificadas usando a PCR multiplex. A especificidade deste teste para detectar *C. coli* e *C. jejuni* foi de 97%.

Poucos estudos utilizando PCR multiplex para detectar e diferenciar *C. jejuni* e *C. coli* em alimentos têm sido relatados (WINTERS e SLAVIK, 2000, NAYAK et al., 2005). A identificação precisa destes organismos é necessária a fim de decidir sobre medidas terapêuticas apropriadas, entender a patologia da doença e fornecer dados clínicos e epidemiológicos para o controle da doença (WANG et al., 2002). Além disso, a identificação e a discriminação dessas duas espécies em alimentos são importantes para estudos epidemiológicos e de análise de riscos.

Uma adesina denominada CadF, que promove a ligação de *Campylobacter* à fibronectina e, conseqüentemente a célula epitelial é conservada entre os isolados de *Campylobacter* (KONKEL et al., 1999). Iniciadores desenhados com base na seqüência do gene *cadF* de *C. jejuni* já foram previamente testados (CHENG e GRIFFITHS, 2003; OLIVEIRA et al., 2005a).

O gene *mapA* que codifica uma proteína de membrana espécie-específica de *C. jejuni* chamado MAPA e o gene *ceuE* que codifica um polipeptídeo envolvidos no

transporte de sideróforos foram usados anteriormente como alvos na PCR para identificação específica de *C. jejuni* e *C. coli*, respectivamente (STUCKI et al., 1995; GONZALEZ et al., 1997).

REFERÊNCIAS

- Aarts HJM; Joosten RG; Henkens MHC; Stegeman H; van Hoek AHAM. Rapid duplex PCR assay for the detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* strains. *J. Microbiol. Methods*, 47:209-217, 2001.
- Adams RD; Victor M. *Principles of Neurology*. 4. ed. McGraw-Hill, EUA, 1989.
- Ahmed W; Sawant S; Huygens F; Goonetilleke A; Gardner T. Prevalence and occurrence of zoonotic bacterial pathogens in surface waters determined by quantitative PCR. *Water Research*, 43: 4918-4928, 2009.
- Allmann M; Höfelein C; Köppel E; Lüthy J; Meyer R; Niederhauser C; Wegmüller B; Candrian U. Polymerase chain-reaction (PCR) for detection of pathogenic microorganisms in bacteriological monitoring of dairy-products. *Res. Microbiol.*, 146:85-97, 1995.
- Allos BM; Lippy FT; Carlsen A; Washburn RG; Blaser MJ. *Campylobacter jejuni* strains from patients with Guillain-Barre syndrome. *Emerging Infect. Dis.*, 4:263-268, 1998.
- Allos, BM. Association between *Campylobacter* infection and Guillain-Barré Syndrome. *J. Infect. Dis.*, 176:S125-S128, 1997.
- Altekruse SF; Stern NJ; Fields PI; Swerdlow DL. *Campylobacter jejuni* - an emerging foodborne pathogen. *Emerg. Infect. Dis.*; 5:28-35, 1999.
- Altekruse SF; Swerdlow DL; Stern NJ. *Campylobacter jejuni*. *Vet. Clin. North. Am. Food. Anim. Pract.*; 14:31-40, 1998.
- Barrett TJ; Patton CM; Morris GK. Differentiation of *Campylobacter* species using phenotypic characterization. *Lab. Med.*, 19:96-102, 1988.
- Bej AK; Steffan RJ; Dicesare J; Haff L; Atlas RM. Detection of coliform bacteria in water by polymerase chain-reaction and gene probes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56:307-314, 1990.
- Best EL; Powell EJ; Swift C; Grant KA; Frost JA. Applicability of a rapid duplex real-time PCR assay for speciation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* directly from culture plates. *FEMS Microbiol. Lett.* 229:237-241, 2003.
- Beumer RR; de Vries J; Rombouts FM. *Campylobacter jejuni* non-culturable coccoid cells. *Int. J. Food Microbiol.* 15:153-163, 1992.
- Black RE; Levine MM; Clements ML; Hughes TP; Blaser J. Experimental *Campylobacter jejuni* infection in humans. *J. Infect. Dis.*, 157:472-479, 1998.
- Blaser MJ; Bercowitz ID; Laforce FM; Cravens J; Reller LB; Wang W. LL. *Campylobacter enteritis*: clinical and epidemiological features. *Annals of Internal Medicine*, 91:179-185, 1979.
- Blaser MJ; Duncan DJ. Human-serum antibody-response to *Campylobacter jejuni* infection as measured in an enzyme linked immunosorbent-assay. *Clinical Research* 32:A81-A81, 1984.

- Blaser MJ; Wells JG; Feldman RA; Pollard RA; Allen JR. *Campylobacter* enteritis in the United States: a multicenter study. *Annals of Internal Medicine.*, 98:360-365., 1983.
- Blaser, MJ. Epidemiological and clinical features of *Campylobacter jejuni* infections. *J. Infect. Dis.*, 176:S103-S105, 1997.
- Bolton FJ; Robertson L. A selective medium for isolating *Campylobacter jejuni-coli*. *J. Clin. Pathol.*, 35:462-467, 1982.
- Butzler JP. *Campylobacter*, from obscurity to celebrity. *Clin. Microbiol. Infect.*, 10:868-876, 2004.
- Butzler JP; Dekeyser P; Detrain M; Dehaen F. Related vibrio in stolls. *Journal of Pediatrics*, 82:493-495, 1973.
- Butzler, JP. *Campylobacter infection in man and animals*. Boca Raton:CRC. 1984, 246p.
- Cason JA; Bailey JS; Stern NJ; Whittemore AD; Cox NA. Relationship between aerobic bacteria, Salmonellae and *Campylobacter* on broiler carcasses. *Poult. Sci.*, 76:1037-1041, 1997.
- CDC-CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. *Campylobacter* Infections. Disponível em: <http://www.cdc.gov/nczved/divisions/dfbmd/diseases/Campylobacter/> Acesso em 08 de abril de 2010.
- Chamberlain JS; Gibbs RA; Ranier JE; Nguyen PN; Caskey CT. Deletion screening of the duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acids Res.* 16:11141–11156, 1988.
- Chamberlain JS; Gibbs RA; Ranier JE; Nguyen PN; Caskey CT. Multiplex PCR for the diagnosis of duchenne muscular dystrophy. In: Gelfand DH; Innis MA; Shinsky JJ; White TJ. (Eds). *PCR protocols: a guide to methods and applications*, San Diego:Academic Press, 1989. p. 272–281.
- Cheng Z; Griffiths MW. Rapid detection of *Campylobacter jejuni* in chicken rinse water by melting-peak analysis of amplicons in real-time polymerase chain reaction. *J. Food Prot.*; 66:1343-52, 2003.
- Colle I; Van Vlierberghe H; Troisi R; De Ridder K; Benoit D; Hemptinne B; De Vos M. *Campylobacter*-associated Guillain-Barre syndrome after orthotopic liver transplantation for hepatitis C cirrhosis: a case report. *Hepatology Research*, 24:205-211, 2002.
- Corry JEL; Post DE; Colin P; Laisney MJ. Culture media for the isolation of *Campylobacters*. *Int. J. Food Microbiol.* 26:43-76, 1995.
- Cowden J. *Campylobacter*: epidemiological paradoxes. *Br. Med. J.*, 305:132-133, 1992.
- Debretson A; Habtemariam T; Wilson S; Nganwa D; Yehualaeshet T. Real-time PCR assay for rapid detection and quantification of *Campylobacter jejuni* on chicken rinses from poultry processing plant. *Mol. Cell. Probes*, 21:177-181, 2007.

- Denis M; Soumet C; Rivoal K; Ermel G; Blivet D; Salvat G; Colin P. Development of a m-PCR assay for simultaneous identification of *Campylobacter jejuni* and *C. coli*. *Lett. Appl. Microbiol.*, 29:406-410, 1999.
- Doyle MP; Roman DJ. Response of *Campylobacter jejuni* to sodium-chloride. *Appl. Environ. Microbiol.*, 43:561-565, 1982.
- Elnifro EM; Ashshi AM; Cooper RJ; Klapper PE. Multiplex PCR: optimization and application in diagnostic virology. *J. Clin. Microbiol.*, 13:559-570, 2000.
- Endtz HP; Ruijs GJ; van Klingeren B; Jansen WH; van der Reyden T; Mouton RP. Quinolone resistance in *Campylobacter* isolated from man and poultry following the introduction of fluoroquinolones in veterinary medicine. *J. Antimicrob. Chemother.*, 27:199-208, 1991.
- Englen MD; Kelley LC. A rapid DNA isolation procedure for the identification of *Campylobacter jejuni* by the polymerase chain reaction. *Lett. Appl. Microbiol.* 31:421-426, 2000.
- Eyers M; Chapelle S; Vancamp G; Goossens H; Wachter R. Discrimination among thermophilic *Campylobacter* species by polymerase chain reaction amplification of 23S rRNA gene fragments. *J. Clin. Microbiol.*, 31:3340-3343, 1993.
- Eyigor A; Dawson KA; Langlois BE; Pickett CL. Cytolethal distending toxin genes in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates: detection and analysis by PCR. *J. Clin. Microbiol.*, 37:1646-1650, 1999.
- Eyigor A; Dawson KA; Langlois BE; Pickett CL. Detection of cytolethal distending toxin activity and *cdt* genes in *Campylobacter* spp. isolated from chicken carcasses. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65:1501-1505, 1999.
- Fahey T; Morgan D; Gunneburg C; Adak GK; Majid F; Kaczmarek, E. An outbreak of *Campylobacter-jejuni* enteritis associated with failed milk pasteurization. *J. Infect.*, 31:137-143, 1995.
- Fermér C; Engvall EO. Specific PCR identification and differentiation of the thermophilic *Campylobacters*, *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, and *C. upsaliensis*. *J. Clin. Microbiol.*, 37:3370-3373, 1999.
- Fernandez H; Vergara M; Tapia F. Desiccation resistance in thermotolerant *Campylobacter* species. *Infection*, 13:197, 1985.
- Fox JG; Hering AM; Ackerman JI; Taylor NS. The pet hamster as a potential reservoir of human *Campylobacteriosis*. *J. Infect. Dis.*, 147:784, 1983.
- Franchin PR; Aidoo KE; Batista CRV. Sources of poultry meat contamination with thermophilic *Campylobacter* before slaughter. *Braz. J. Microbiol.*, 36: 187-163, 2005.
- Friedman CR; Hoekstra RM; Samuel M; Marcus R; Bender J; Shiferaw B; Reddy S; Ahuja SD; Helfrick DL; Hardnett F; Carter M; Anderson B; Tauxe RV. Risk factors for sporadic *Campylobacter* infection in the United States: a case-control study in FoodNet sites. *Clin. Inf. Dis.*, 38:S285-S296, 2004.

- Friedman CR; Neimann J; Wegener HC; Tauxe RV. Epidemiology of *Campylobacter jejuni* infections in the United States and other industrialized nations. In: Nachamkin I; Blaser MJ. (Eds). *Campylobacter*, 2nd ed. Washington, DC:ASM Press, 2000. p. 121-138.
- Giesendorf BAJ; Quint WGV. Detection and identification of *Campylobacter* spp. using the polymerase chain reaction. *Cell. Mol. Biol.*, 41:625–638, 1995.
- Giesendorf BAJ; Quint WGV; Henkens MHC; Stege-Man H; Huf FA; Hieslers HGM. Rapid and sensitive detection of *Campylobacter* spp. in chicken products by using the polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58:3804-3808, 1992.
- Gonzalez I; Grant KA; Richardson PT; Park SF; Collins MD. Specific identification of the enteropathogens *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by using a PCR test based on the *ceuE* gene encoding a putative virulence determinant. *J. Clin. Microbiol.*, 35:759-763, 1997.
- Goossens H; Pot B; Vlaes L; Van den Borre C; Van den Abbeele R; Van Naelten C; Levy J; Cogniau H; Marbehant P; Verhoef J; Kersters K; Butzler JP; Vandamme P. Characterization and description of *Campylobacter-upsaliensis* isolated from human feces. *J. Clin. Microbiol.*, 28:1039-1046, 1990.
- Grando AA; Wagner SC. Avaliação laboratorial da doença residual mínima na leucemia mielóide crônica por Real-Time PCR. *J. Bras. Patol. Med. Lab.*, 44:433:440, 2008.
- Grennan B; O'Sullivan NA; Fallon R; Canroll C; Smith T; Glennon M; Maher M. PCR-ELISAs for the detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in poultry samples. *BioTech.*, 30:602-610, 2001.
- Gunther NW; Chen CY. The biofilm forming potential of bacterial species in the genus *Campylobacter*. *Food Microbiol.*, 26:44–51, 2009.
- Hadden RD; Hughes RA. Guillain-Barré syndrome: recent advances. *Hosp. Med.*, 59:55-60, 1998.
- Harmon KM; Ransom GM; Wesley IV. Differentiation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by polymerase chain reaction. *Mol. Cell. Probes*, 11:195–200, 1997.
- Harrison WA; Griffith CJ; Tennant D; Peters AC. Incidence of *Campylobacter* and *Salmonella* isolated from retail chicken and associated packaging in South Wales. *Lett. Appl. Microbiol.*, 33:450 -454, 2001.
- Harvey S; Greenwood JR. Isolation of *Campylobacter fetus* from a pet turtle. *J. Clin. Microbiol.*, 21:260-261, 1985.
- Hazeleger W; Arkesteijn C; Toorop-Bouma A; Beumer R. Detection of the coccoid form of *Campylobacter jejuni* in chicken products with the use of the polymerase chain reaction. *Intern. J. Food Microbiol.*, 24:273-281, 1994.
- Heid CA; Stevens J; Livak KJ; Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res.*, 6:986-994, 1996.

- Hernandez J; Alonso JL; Fayos A; Amoros I; Owen RJ. Development of a PCR assay combined with a short enrichment culture for detection of *Campylobacter-jejuni* in estuarine surface waters. *FEMS Microbiol. Lett.*, 127:201-206, 1995.
- Heuvelink AE; van Heerwaarden C; Zwartkruis-Nahuis A; Tilburg JJHC; Hanna Bos M; Heilmann FGC; Hofhuis A; Hoekstra T; de Bôer E. Two outbreaks of Campylobacteriosis associated with the consumption of raw cows' milk. *Int. J. Food Microbiol.*, 134:70-74, 2009.
- Holland PM; Abramson RD; Watson R; Gelfan DD. Detection of specific polymerase chain reaction by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 88:7276-80, 1991.
- Hong BX, Jiang LF, Hu YS, Fang DY, Guo HY. Application of oligonucleotide array technology for the rapid detection of pathogenic bacteria of foodborne infections. *J. Microbiol. Methods*, 58:403–411, 2004.
- Houng HSH; Sethabutr O; Nirdnoy W; Katz DEP; Pang LW. Development of a *ceuE*-based multiplex polymerase chain reaction (PCR) assay for direct detection and differentiation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in Thailand. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*; 40:11-19, 2001.
- Hughes RAC; Rees JH. Clinical and epidemiological features of Guillain-Barré syndrome. *J. Infect. Dis.*, 176:S92-S98.1997.
- Humphrey TJ. Techniques for the optimum recovery of cold injured *Campylobacter jejuni* from milk or water. *J. Appl. Bacteriol.*, 61:125–132, 1986.
- Hussain I; Mahmood MS; Akhtar M; Khan A. Prevalence of *Campylobacter* species in meat, milk and other food commodities in Pakistan. *Food Microbiol.*, 24:219- 22, 2007.
- Hutchinson DN; Bolton FJ. Improved blood free selective medium for the isolation of *Campylobacter jejuni* from fecal specimens. *J. Clin. Pathol.* 37:956-957, 1984.
- Hutchinson DN; Bolton FJ. Is enrichment culture necessary for the isolation of *Campylobacter jejuni* from faeces? *J. Clin. Pathol.*, 36:1350-1352, 1983.
- ICMSF, *Microorganisms in foods. Characteristics of microbial pathogens*, vol. 5. Blackie A&P, London, pp. 45–65. 1996.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. Indicadores de produção pecuária. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br>. Acesso em 21 de julho de 2009.
- Itoh R; Saitoh S; Yatsuyanagi J. Specific detection of *Campylobacter-jejuni* by means of polymerase chain-reaction in chicken litter. *J. Vet. Med. Sci.*, 57:125-127, 1995.
- Jackson CJ; Fox AJ; Jones DM. A novel polymerase chain reaction assay for the detection and specification of thermophilic *Campylobacter spp.* *J. Appl. Bacteriol.*, 81:467-473, 1996.
- Jacobs-Reitsma W. *Campylobacter* in the food supply. In: Nachamkin I; Blaser MJ. (Eds). *Campylobacter*, 2nd ed. Washington, DC:ASM Press, 2000. p. 467–482.

- Jones DM, Abbott JD, Painter MJ, Sutcliffe EM. A comparison of biotypes and serotypes of *Campylobacter* sp. isolated from patients with enteritis and from animal and environmental sources. *J. Infect.*, 9:51-8, 1984.
- Jones DM; Sutcliffe EM; Curry A. Recovery of viable but non-culturable *Campylobacter jejuni*. *J. Gen. Microbiol.*, 137:2477-2482, 1991.
- Jones DM; Sutcliffe EM; Rios R; Fox AJ; Curry A. *Campylobacter jejuni* adapts to aerobic metabolism in the environment. *J. Med. Microbiol.*, 38:145-150, 1993.
- Jones IG; Roworth M. An outbreak of *Escherichia coli* O157 and Campylobacteriosis associated with contamination of a drinking water supply. *Public Health*, 110: 277-282, 1996.
- Jorgensen F; Bailey R; Williams S; Henderson P; Wareing DRA; Bolton FJ; Frost JA; Ward L; Humphrey TJ. Prevalence and numbers of *Salmonella* and *Campylobacter* spp. on raw, whole chickens in relation to sampling methods. *Int. J. Food. Microbiol.*, 76:151-64, 2002.
- Joshua GW; Guthrie-Irons C; Karlyshev AV; Wren BW. Biofilm formation in *Campylobacter jejuni*. *Microbiol.*, 152:387-396, 2006.
- Kaiser K; Rabodonirina M; Picot S. Real time quantitative PCR and RT-PCR for analysis of *Pneumocystis carinii hominis*. *J. Microbiol. Methods*, 45:113-118, 2001.
- Karmali MA; Simon AE; Roscoe M; Fleming, PC; Smith SS; Lane J. Evaluation of a blood-free, charcoal-based, selective medium for the isolation of *Campylobacter* organisms from feces *J. Clin. Microbiol.*, 23:456-459, 1986.
- Ketley JM. Pathogenesis of enteric infection by *Campylobacter*. *Microbiology*, 143:5-21, 1997.
- Khanna MR, Bhavsar SP, Kapadnis BP. Effect of temperature on growth and chemotactic behaviour of *Campylobacter jejuni*. *Lett. Appl. Microbiol.*, 43:84-90, 2006.
- Konkel ME; Gray SA; Kim BJ; Garvis SG; Yoon J. Identification of the enteropathogens *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* based on the *cadF* virulence gene and its product. *J. Clin. Microbiol.*, 37:510-517, 1999.
- Korolik V; Friendship DT; Peduru-Hewa T; Alfredson DA; Fry BN; Coloe PJ. Specific identification, grouping and differentiation of *Campylobacter jejuni* among thermophilic *Campylobacter* using multiplex PCR. *Epidemiol. Infect.*, 127:1-5, 2001.
- Kramer JM; Frost JA; Bolton FJ; Wareing DRA. *Campylobacter* contamination of raw meat and poultry at retail sale: identification of multiple types and comparison with isolates from human infections. *J. Food Prot.*, 63:1654-1659, 2000.
- Kuroki S; Saida T; Nukina M; Haruta T; Yoshioka M; Kobayashi Y; Nakanishi H. *Campylobacter jejuni* strains from patients with Guillain-Barré syndrome belong mostly to Penner serogroup 19 and contain B-N-acetylglucosamine residues. *Ann. Neurol.*, 33:243-247, 1993.

- LaGier MJ; Joseph LA; Passaretti TV; Musser KA; Cirino, NM. A real-time multiplexed PCR assay for rapid detection and differentiation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Mol. Cell. Probes*, 18:275-282, 2004.
- Lastovica AJ; Skirrow MB. Clinical significance of *Campylobacter* and related species other than *C. jejuni* and *C. coli*. In: Nachamkin I; Blaser MJ. (Eds). *Campylobacter*, 2nd ed. Washington, DC:ASM Press, 2000. p. 89-120.
- Lawson AJ; Logan JMJ; O'Neill GL; Desai M; Stanley J. Large-scale survey of *Campylobacter* species in human gastroenteritis by PCR and PCR-enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.*, 37:3860-3864, 1999.
- Lee SK. The 3'-5' exonuclease of human DNA polymerase δ (pol δ) is regulated by pol δ accessory factors and deoxyribonucleoside triphosphates. *Nucl. Ac. Res.*; 21:1935-1939, 1993.
- Lehtola MJ; Pitkanen T; Miebach L; Miettinen IT. Survival of *Campylobacter jejuni* in potable water biofilms: a comparative study with different detection methods. *Water Sci. Technol.*, 54:57-61, 2006.
- Lilja L; Hanninen ML. Evaluation of a commercial automated ELISA and PCR-method for rapid detection and identification of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* in poultry products. *Food Microbiol.*, 18:205-209, 2001.
- Line JE. Development of a selective differential agar for isolation and enumeration of *Campylobacter* spp. *J. Food Prot.*, 64:1711-1715, 2001.
- Livak KJ; Flood SJA; Marmaro J; Giusti W; Deetz K. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic-acid hybridization. *PCR - Methods Appl.*, 4:357-362, 1995.
- Logan JMJ; Edwards KJ; Saunders NA; Stanley J. Rapid identification of *Campylobacter* spp. by melting peak analysis of bioprobes in real-time PCR. *J. Clin. Microbiol.*, 39:2227-2232, 2001.
- Lund M; Nordentoft S; Pedersen K; Madsen M. Detection of *Campylobacter* spp. in chicken fecal samples by real-time PCR. *J. Clin. Microbiol.*, 42: 5125-5132, 2004.
- Malorny B; Tassios PT; Radström P; Cook N; Wagner M; Hoorfar J. Standardization of diagnostic PCR for the detection of foodborne pathogens. *Intern. J. Food Microbiol.*, 83:39-48, 2003.
- Marcelino FC. Avaliação de resíduos de transgênicos em alimentos no Brasil e desenvolvimento de metodologias de análise. Viçosa, 2006, 132p (Tese de Doutorado).
- Martin KW; Mason MJ; McAlpine KT; Humphrey TJ. A *Campylobacter* medium for all seasons? In: Newell DG; Ketley JM, Feldman RA (Eds). *Campylobacters, Helicobacters, and related organisms*, New York:Plenum Press, 1996. p: 61-65.
- Maziero MT; Oliveira TCRM. Effect of refrigeration and frozen storage on the *campylobacter jejuni* recovery from naturally contaminated broiler carcasses. *Braz. J. Microbiol.*, 41:501-505, 2010.

- Mead GC. Microbiological quality of poultry meat: a review. *Rev. Bras. Cienc. Avic.*; 6:135-42, 2004.
- Medema GJ; Schets FM; van de Giessen AW; Havelaar AH. Lack of colonization of 1 day old chicks by viable, non-culturable *Campylobacter jejuni*. *J. Appl. Bact.*, 72:512–516, 1992.
- Metherell LA; Logan JMJ; Stanley J. PCR-enzyme-linked immunosorbent assay for detection and identification of *Campylobacter* species: application to isolates and stool samples *J. Clin. Microbiol.*, 37:433-435, 1999.
- Mishu B; Ilyas AA; Koski CL; Vriesendorp F; Cook SD; Mithen FA; Blaser MJ. Serologic evidence of previous *Campylobacter jejuni* infection in patients with the Guillain-Barré syndrome. *Ann. Intern. Med.*, 118:947-53, 1993.
- Moreno Y; Hernández M; Ferrús MA; Alonso JL; Botella S; Montes R; Hernández J. Direct detection of thermotolerant *Campylobacters* in chicken products by PCR and in situ hybridization. *Res. Microbiol.*, 152:577-582, 2001.
- Mullis KB; Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Meth. Enzymol.*, 155:335–350, 1987.
- Nachamkin I. *Campylobacter* enteritis and the Guillain-Barré syndrome. *Curr. Infect. Dis. Rep.*, 3:116-122, 2001.
- Nachamkin I; Allos BM; Ho T. *Campylobacter* species and Guillain-Barré syndrome. *Clin. Microbiol. Rev.*, 11:555-67, 1998.
- Nayak R; Stewart TM; Nawaz MS. PCR identification of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* by partial sequencing of virulence genes. *Mol. Cell. Probes*, 19:187–193, 2005.
- Ng LK; BinKingombe CI; Yan W; Taylor DE; Hiratsuka K; Malik N; Garcia MM. Specific detection and confirmation of *Campylobacter jejuni* by DNA hybridization and PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63:4558-4563, 1997.
- Nguyen HTT; Corry JEL; Miles CA. Heat resistance and mechanism of heat inactivation in thermophilic *Campylobacters*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72:908-913, 2006.
- Nicholson MA; Patton CM. Application of Lior Biotype by use of genetically identified *Campylobacter* strains. *J. Clin. Microbiol.*, 31:3348-3350, 1993.
- Nogva HK; Bergh A; Holck A; Rudi K. Application of the 5'-nuclease PCR assay in evaluation and development of methods for quantitative detection of *Campylobacter jejuni*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66:4029-2036, 2000.
- Novais CM; Pires-Alves M. PCR em tempo real. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*, 33:10-13, 2004.
- O'Sullivan NA; Fallon R; Carroll C; Smith T; Mehar M. Detection and differentiation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in broiler chicken samples using PCR/DNA probe membrane based colorimetric assay. *Mol. Cell. Probes*, 14:7–16. 2000.

- Obiri-Danso K; Paul N; Jones K. The effects of UVB and temperature on the survival of natural populations and pure cultures of *Campylobacter jejuni*, *Camp. coli*, *Camp. lari* and urease-positive thermophilic *Campylobacters* (UPTC) in surface waters. *J. Appl. Microbiol.*, 90:256–267, 2001.
- Oliveira TCRM; Barbut S; Griffiths MW. A robotic DNA purification protocol and real-time PCR for the detection of *Campylobacter jejuni* in foods. *J. Food Prot.*, 68: 2131-2135, 2005a.
- Oliveira TCRM; Barbut S; Griffiths MW. Detection of *Campylobacter jejuni* in naturally contaminated chicken skin by melting peak analysis of amplicons in real-time PCR. *Int. J. Food. Microbiol.*, 104: 105-111, 2005b.
- On SLW; Holmes B. Assessment of enzyme detection tests useful in identification of *Campylobacteria*. *J. Clin. Microbiol.*, 30:746-749, 1992.
- On SLW; Holmes B. Effect of inoculum size on the phenotypic characterization of *Campylobacter* species. *J. Clin. Microbiol.*, 29:923–926, 1991.
- On SLW; Holmes B. Reproducibility of tolerance tests that are useful in the identification of *Campylobacteria* *J. Clin. Microbiol.*, 29: 1785-1788, 1991.
- Oyofa BA; Rollins DM. Efficacy of filter types for detecting *Campylobacter-jejuni* and *Campylobacter-coli* in environmental water samples by polymerase chain-reaction. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59:4090-4095, 1993.
- Park CE; Smibert RM; Blaser MJ; Vanderzant C; Stern NJ. *Campylobacter*. In: Speck ML (Ed). *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*, 2nd ed. Washington, DC:APHA, 1984. p. 386-404.
- Park SF. The physiology of *Campylobacter* species and its relevance to their role as foodborne pathogens. *Intern. J. Food Microbiol.*, 74:177-188, 2002.
- Pebody RG; Ryan MJ; Wall PG. Outbreaks of *Campylobacter* infection: rare events for a common pathogen. *Commun. Dis. Rep. CDR Rev.* 7:R33-7, 1997.
- Penner JL. The genus *Campylobacter*: a decade of progress. *Clin. Microbiol. Rev.*, 1:157–172, 1988.
- Rasmussen HN; Olsen JE; Jorgensen K; Rasmussen OF. Detection of *Campylobacter jejuni* and *Camp. coli* in chicken faecal samples by PCR. *Lett. Appl. Microbiol.*, 23:363-366, 1996.
- Rees JH, Soudain SE, Gregson NA, Hughes RAC. *Campylobacter jejuni* infection and Guillain-Barré syndrome. *N. Engl. J. Med.*, 333:1374-1379, 1995.
- Rhodes KM; Tattersfield AE. Guillain-Barré syndrome associated with *Campylobacter* infections. *Br. Med. J.*, 285:173-174, 1982.
- Rithidech KN; Dunn JJ; Gordon CR. Combining multiplex and touchdown PCR to screen murine microsatellite polymorphisms. *Biotech.*, 23:36–45, 1997.
- Rollins DM; Colwell RR. Viable but nonculturable stage of *Campylobacter jejuni* and its role in survival in the natural aquatic environment. *Appl. Environ. Microbiol.*, 52:531–538. 1986.

- Rönner AC, Lindmark H. Quantitative detection of *Campylobacter jejuni* on fresh chicken carcasses by real-time PCR. *J. Food Prot.*; 70:1373-78, 2007.
- Sails AD; Bolton FJ; Fox AJ; Wareing DRA; Greenway, DLA. A reverse transcriptase polymerase chain reaction assay for the detection of thermophilic *Campylobacter* spp. *Mol. Cell. Probes*, 12:317-322, 1998.
- Sails AD; Fox AJ; Bolton FJ; Wareing DRA; Greenway DLA; Borrow R. Development of a PCR ELISA assay for the identification of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Mol. Cell. Probes*. 15:291-330, 2001.
- Salloway S, Mermel LA, Seamans M, Aspinall GO, Nam Shin JE, Kurjanczyk LA, Penner JL. Miller-Fisher Syndrome associated with *Campylobacter jejuni* bearing lipopolysaccharide molecules that mimic human ganglioside GD3. *Infect. Immun.*, 64:2945-49, 1996.
- Sanders G. Isolation of *Campylobacter* from food. In: Warburton D (Ed.). *Compendium of analytical methods*, Québec: Polyscience Publications, 1998.
- Scarcelli E; Piatti RM; Harakava R; Miyashiro S; Fernandes FMC; Campos FR; Francisco W; Genovez ME; Richtzenhain LJ. Molecular subtyping of *Campylobacter jejuni* subsp *jejuni* strains isolated from different animal species in the state of Sao Paulo, Brazil. *Braz. J. Microbiol.*, 36:378-382, 2005.
- Sherlock J; Cirigliano V; Petrou M; Tutschek B; Adinolfi M. Assessment of diagnostic quantitative fluorescent multiplex polymerase chain reaction assays performed on single cells. *Ann. Hum. Genet.*, 62:9-23, 1998.
- Shuber AP; Skoletsky J; Stern R; Handelin BL. Efficient 12-mutation testing in the CFTR gene: a general model for complex mutation analysis. *Hum. Mol. Genet.*, 2:153-158, 1993.
- Skeidsvoll J; Ueland PM. Analysis of double-stranded DNA by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection using the monomeric dye SYBR Green I. *Anal. Biochem.*, 231:350-365, 1995.
- Skirrow MB. *Campylobacter* enteritis: a "new" disease. *Br. Med. J.*, 2:9-11, 1977.
- Skirrow MB. Epidemiology of *Campylobacter* enteritis. *Int. J. Food Microbiol.*, 12:9-16, 1991.
- Snelling WJ; Matsudac M; Moorec JE; Dooley JSG. Under the microscope: *Campylobacter jejuni*. *Lett. Appl. Microbiol.*, 41:297-302. 2005.
- Solomon EB; Hoover DG. Inactivation of *Campylobacter jejuni* by high hydrostatic pressure. *Lett. Appl. Microbiol.*, 38:505-509, 2004.
- Stern NJ. Reservoirs for *Campylobacter jejuni* and approaches for intervention in poultry. In: Nachamkin I; Blaser MJ; Tompkins LS (Eds). *Campylobacter jejuni: current status and future trends*, Washington, DC:ASM Press, 1992. p. 49-60.
- Stucki U; Frey J; Icolet J; Burnens AP. Identification of *Campylobacter jejuni* on the basis of a species-specific gene that encodes a membrane protein. *J. Clin. Microbiol.*, 33:855-859, 1995.

- Svedhem A; Kaijser B. *Campylobacter fetus* Subspecies *jejuni*: a common cause of diarrhea in Sweden. *J. Infect. Dis.*, 142:353-359, 1980.
- Tauxe RJ. Epidemiology of *Campylobacter jejuni* infections in the United States and other industrialised nations. In: Nachamkin I; Blaser MJ; Tompkins LS (Eds). *Campylobacter jejuni*: current status and future trends, Washington, DC:ASM Press, 1992. p. 9-19.
- Tauxe RV; Patton CM; Edmonds P; Barrett TJ; Brenner DJ; Blake PA. Illness associated with *Campylobacter laridis*, a newly recognized *Campylobacter* species. *J. Clin. Microbiol.*, 21:222-225, 1985.
- Thomas C; Gibson H; Hill DJ; Mabey M. *Campylobacter* epidemiology: an aquatic perspective. *J. Appl. Microbiol.*, 85:168S-177S, 1999.
- Tosin I; Machado RA. Occurrence of *Campylobacter* spp. in food handlers of hospital kitchens in urban area of Southern region Brazil. *Rev. Saúde Pública*, 29:472-477, 1995.
- Totten PA; Patton CM; Tenover FC; Barrett TJ; Stamm WE; Steigerwalt AG; Lin JY; Holmes KK; Brenner DJ. Prevalence and characterization of hippurate-negative *Campylobacter jejuni* in King County, Washington. *J. Clin. Microbiol.*, 25:1747-52, 1987.
- Trachoo N; Frank JF; Stern NJ. Survival of *Campylobacter jejuni* in biofilms isolated from chicken houses. *J. Food Prot.*, 65:1110-1116, 2002.
- Tresierra-Ayala A; Fernandez H. Occurrence of thermotolerant *Campylobacter* species in domestic and wild monkeys from Peru. *Zentbl. Veterinarmedizin B* 44:61-64, Tyagi S; Kramer FR. Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. *Nat. Biotechnol.*, 14:303-308, 1996.
- Uyttendale M; de Troy P; Debevere J. Incidence of *Salmonella*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* and *Listeria monocytogenes* in poultry carcasses and different types of poultry products for sale on the Belgian retail market. *J. Food. Prot.*, 62:735-40, 1999.
- Vandamme P. *Taxonomy of the family Campylobacteriaceae*. In: Nachamkin I; Blaser MJ. (Eds). *Campylobacter*, 2nd ed. Washington, DC:ASM Press, 2000. p. 3-26.
- Vandamme P; Dewhirst FE; Paster BJ; On SLW. Genus I. *Campylobacter*. In: Garrity, GM. (Ed). *Bergey's Manual of systematic bacteriology*, 2nd ed. New York: Springer, 2005. p.1147-1160.
- Vanniasinkam T; Lanser JA; Barton MD. PCR for the detection of *Campylobacter* spp. in clinical specimens. *Lett. Appl. Microbiol.*, 28:52-56, 1999.
- Vitzthum F; Geiger,G; Bisswanger H; Brunner H; Bernhagen, J. A quantitative fluorescence-based microplate assay for the determination of doublestranded DNA using SYBR Green and a standard ultraviolet transilluminator gel imaging system. *Anal Biochem.*, 276:59-64, 1999.

- Waage AS; Varund T; Lund B; Kapperud G. Detection of small numbers of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in environmental water, sewage, and food samples by a semi-nested PCR assay. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65:1636-1643, 1999.
- Waegel A, Nachamkin, I. Detection and molecular typing of *Campylobacter jejuni* in fecal samples by polymerase chain reaction. *Mol. Cell. Probes*, 10:75-80, 1996.
- Wang, GH; Clark, CG; Taylor, TM, Pucknell, C, Barton, C, Price, L, Woodward, DL, Rodgers FG. Colony multiplex PCR assay for identification and differentiation of *Campylobacter jejuni*, *C-coli*, *C-lari*, *C-upsaliensis*, and *C-fetus* subsp *fetus*. *J. Clin. Microbiol.*, 40:4744-4747, 2002.
- Waterman SR; Small PL. Acid-sensitive enteric pathogens are protected from killing under extremely acidic conditions of pH 2.5 when they are inoculated onto certain solid food surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64:3882-6, 1998.
- Wegmuller B; Luthy J; Candrian U. Direct polymerase chain reaction detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in raw milk and dairy products. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59:2161-2165, 1993.
- Winters DK; Slavik MF. Evaluation of a PCR based assay for specific detection of *Campylobacter jejuni* in chicken washes. *Mol. Cell. Probes*, 9:307-310, 1995.
- Winters DK; Slavik MF. Multiplex PCR detection of *Campylobacter jejuni* and *Arcobacter butzleri* in food products. *Mol. Cell. Probes*, 14:95-99, 2000.
- Wittwer CT; Ririe KM; Andrew RV; David DA; Gundry RA; Balis UJ. The LightCycler: a microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control. *Biotech.*, 22:176-81, 1997
- Workman SN; Mathison, GE; Lavoie, MC. Pet dogs and chicken meat as reservoirs of *Campylobacter* spp. in Barbados. *J. Clin. Microbiol.*, 43:2642-50, 2005.
- Yang C; Jiang Y; Huang K; Zhu C; Yin Y; Gong JH; Yu H. A Real-time PCR Assay for the detection and quantitation of *Campylobacter jejuni* using SYBR Green I and the LightCycler. *Yale J. Biol. Med.*, 77:125-132, 2004.
- Yang-Chih Shih D. Isolation and identification of enteropathogenic *Campylobacter* spp. from chicken samples in Taipei. *J. Food Prot.*, 63:304-308, 2000.
- Zhao C; Ge B; De Villena J; Sudler R; Yeh E; Zhao S; White DG; Wagner D; Meng J. Prevalence of *Campylobacter* spp., *Escherichia coli*, and *Salmonella* serovars in retail chicken, turkey, pork, and beef from the Greater Washington, D.C., area. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67:5431-36, 2001.
- Zimmermann K; Schogl D; Plaimauer B; Mannhalter JW. Quantitative multiplex competitive PCR of HIV-1 DNA in a single reaction tube. *Biotech.* 21:480-484, 1996.
- Zou S; Stansfield C; Bridge J. Identification of new influenza B virus variants by multiplex reverse transcription-PCR and the heteroduplex mobility assay. *J. Clin. Microbiol.* 36:1544-1548, 1998.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo, os resultados e discussão estão apresentados na forma de artigos científicos

ARTIGO 1: Multiplex Plymerase Chain Reaction (PCR) Assay for Detection and Differentiation ff *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in Chicken Carcasses

Kérley Braga Pereira Bento Casaril^{1,2}; Juliane Alves²; Gislayne Trindade Vilas-Bôas³; Tereza Cristina Rocha Moreira de Oliveira²

¹Universidade Estadual do Oeste do Paraná, UNIOESTE, Campus de Francisco Beltrão

²Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Londrina, UEL

³Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Londrina, UEL

ABSTRACT

In Brazil, the incidence of campylobacteriosis and the post infection complications are unknown. Although Brazil is the largest world exporter of chicken meat there is little information on the contamination of this product by *Campylobacter*. The aim of this study was to develop a multiplex PCR for the detection and differentiation between *C. jejuni* and *C. coli*. The PCR was developed using *mapA* primers specific for detection of *C. jejuni* and *ceuE* primers specific for detection of *C. coli*. The developed PCR was tested on 11 different isolates of *Campylobacter* and on 22 non-*Campylobacter* species and the specificity was 100%. The PCR assay was tested with spiked and naturally contaminated chicken carcasses. *Campylobacter* was detected from chicken skin artificially contaminated with approximately 50 colony forming unit (CFU) of *Campylobacter* per 10-g after 48 h of selective enrichment. Specific DNA fragments of the PCR confirmed the presence of *C. jejuni* (202-bp) and or *C. coli* (889-pb) from thirteen (46.4%) out of 28 analyzed chicken carcasses purchased from local retail market. The developed multiplex PCR was found to be sensitive and specific on the detection and simultaneous differentiation of *C. jejuni* and *C. coli* after 48h of analysis.

KEYWORDS: *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, Multiplex PCR

1. INTRODUCTION

Thermophilic *Campylobacter* species, particularly *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*, are common causes of acute bacterial gastroenteritis in most part of the world (ALTEKRUSE et al., 1999; HOUNG et al., 2001; DEBRUYNE et al., 2008). *C. jejuni* has also been associated with post infection complications including arthritis, Guillain-Barré Syndrome (GBS), Miller-Fisher Syndrome and Reiter Syndrome (SALLOWAY et al., 1996; ALTEKRUSE et al., 1998; THOMAS et al., 1999; HONG et al., 2005).

Poultry and poultry products have been implicated as the major vehicles for *Campylobacter* infection (O'SULLIVAN et al., 2000; JORGENSEN et al., 2002; MEAD, 2004; HUSSAIN et al., 2007). Data from different countries indicate high prevalence of *Campylobacter* in raw poultry products (JORGENSEN et al., 2002; UYTTENDALE et al., 1999; ZHAO et al., 2001). In a recent study conducted in Londrina, Paraná, Brazil, 93.3% of chicken carcasses examined were contaminated with *Campylobacter* spp. and 50% of the samples examined after the enrichment were positive for *C. jejuni* (MAZIERO and OLIVEIRA, 2010). Franchin et al. (2005) studied the possible sources of *Campylobacter* spp. in poultry meat before slaughter from a poultry integration system in southern Brazil. Thermophilic *Campylobacter* were detected in 22 of 24 chicken batches destined to slaughter, corresponding to 91.7% of the contaminated batches. *Campylobacter* was found in 79.2% of the feather samples, followed by cloacal swabs (75.0%).

Campylobacter spp. have fastidious growth requirements and few biochemical tests can be applied for the phenotypic identification to species level. Traditionally, *C.*

jejuni and *C. coli* were differentiated on the basis of hippurate hydrolysis test. However, the test is not always reliable and, even though the hippuricase gene is only found in *C. jejuni*, several strains have been found to be hippurate-negative. In addition, non-*C. jejuni* species have shown false-positive results (TOTTEN et al., 1987; ON and JORDAN, 2003).

Conventional methods for the isolation of *Campylobacter* from foods, water or environmental samples are time-consuming and labor-intensive which limits their use especially in the microbiological quality control of perishable foods (CORRY et al., 1995). The molecular methods such as polymerase chain reaction (PCR) have been developed for the detection, identification and quantification of *Campylobacter* spp. in food (CHENG and GRIFFITHS, 2003; JOTHIKUMAR et al., 2003; WANG et al., 2004).

Molecular assays also have been developed to detect and discriminate closely related thermophilic *Campylobacter*. Most of these assays have used a variety of species-specific genes such as *omp50*, 16S *rRNA*, 23S *rRNA*, *hipO*, *ceuE*, *mapA*, putative aspartokinase or *cadF* (ON and JORDAN, 2003; CHENG and GRIFFITHS, 2003; GIESENDORF et al., 1995; DENIS et al., 1999; GORKIEWICZ et al., 2003; DEDIEU et al., 2004; NAYAK et al., 2005).

The gene *mapA* encoding a species-specific membrane protein of *C. jejuni* named MAPA and the gene *ceuE* that encodes a polypeptide involved in siderophore transport were used previously as targets in PCR for a specific identification of *C. jejuni* (STUCKI et al., 1995) and *C. coli* (GONZALEZ et al., 1997), respectively.

The aim of this study was to develop a multiplex PCR targeting *mapA* gene and *ceuE* gene for the detection and differentiation between *C. jejuni* and *C. coli*. The developed PCR assay was tested with spiked and naturally contaminated chicken carcasses.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Bacterial strains

A total of 11 *Campylobacter* strains and 22 non-*campylobacter* strains were included in this study (Table 1).

Campylobacter strains were grown in Bolton broth (CM0983, Oxoid, Cambridge, UK) at 37 °C for 48 h under microaerobic conditions (5% oxygen, 10% carbon dioxide, and 85% nitrogen) created with the Probac microaerobic system (Probac, Santa Cecília, São Paulo, Brazil). Non-*campylobacter* strains were cultivated in brain heart infusion broth (Acumedia, Lansing, Michigan, USA) at 37 °C for 24 h.

2.2 Inoculation of chicken skin and microbiological analysis

Skin-on chicken thighs and breast portions were bought from a local supermarket. Three 10-g samples of skin from each portion were inoculated by adding *C. jejuni* or *C. coli* to obtain a cell number of approximately 1, 10, or 50 CFU/10g. The skin samples were placed in a Stomacher 400 (Seward, Worthing, England) filter bag, and 10 ml of Bolton broth (CM0983, Oxoid) was added. The mixture was shaken for 1 min. Aliquots of 5 ml of the rinse were added to 45 ml of Bolton broth (CM0983, Oxoid) with a modified Bolton broth selective supplement (SR0208E, Oxoid) and incubated at 37 °C for 3 h and then at 42 °C for 45 h under microaerobic conditions. After incubation, 0.1 ml of enrichment broth were subcultured in agar plates (CM0983, Oxoid) containing selective supplement (SR0208E, Oxoid), and the culture plates were incubated microaerobically at 37 °C for 48 h. The presumptive *Campylobacter* spp. identification was based on colony morphology and Gram stain

and hippurate hydrolysis test. The same procedure was performed with 10-g samples of uninoculated strain, as negative controls.

2.3 Examination of naturally contaminated chicken skin

Twenty-eight skin-on portions of chicken (thighs and breast) purchased from a local supermarket were analyzed. Ten-gram aliquots of chicken skin from each sample were placed in a Stomacher 400 filter bags. The microbiological analysis was carried out as discussed above.

2.4 DNA extraction

For DNA extraction, aliquots of 1 ml of the bacterial suspensions and 1 ml of the enrichment Bolton broths were centrifuged at 16,000xg for 10 min. The pellets were washed twice with buffered peptone water (Acumedia, Lansing, Michigan, USA) and resuspended in 200 µl of 1% Triton X-100. Suspensions were heated to 100 °C in a water bath for 10 min, cooled in ice, and centrifuged at 16,000xg for 5 min. The supernatants then were used for PCR assay as described bellow.

2.5 Multiplex PCR for detection of *C. jejuni* and *C. coli*

The PCR mixture (20 µl) for all single PCR experiments contained 2 µl of 10x PCR buffer [200 mM Tris-HCl, pH 8.4, 500 mM KCl, (Invitrogen, Eugene, Oregon, USA)], 3.5 mM MgCl₂; 0.4 mM dNTP mixture, 1.0 U *Taq* Polimerase (Invitrogen); 1.0 µM each primer pair of *mapA* and *ceuE*, 4 µl of template DNA, and 8.1 µl of ultrapure water. The oligonucleotides primers used are shown in Table 2. The

amplification reaction was carried out in a thermal-cycler (PTC-100, MJ Research, Waltham, Massachusetts, USA) and include an initial denaturation at 94 °C for 4 min, followed by 35 cycles of denaturation at 94 °C for 1 min, annealing at 53 °C for 1 min and extension at 72 °C for 1 min, and final extension at 72 °C for 6 min.

After PCR, in each amplification reaction 4 µl of buffer 15% Ficoll 400 (Fluka BioChemika, Milwaukee, Wisconsin, USA) and 0.25% Bromophenol blue (LabSynth, Diadema, São Paulo, Brazil) were added. Aliquots of 10 µl of this mixture were loaded onto a 1.5% agarose gel (Laboratory Conda, Madrid, Spain) and the electrophoresis was performed in Tris-Borate-EDTA buffer [45 mM Tris base (Invitrogen); 45 mM boric acid, 1.25 mM EDTA (Nuclear)] at 3W/cm for 1 h and 40 min. The gels were stained with ethidium bromide (10 mg/ml, Invitrogen), visualized under UV light in transillumination (Vilber Lourmat, Torcy, ZI, France) and registered in photo documentation system Doc-print (Vilber Lourmat). A 100-bp DNA ladder (Invitrogen) was included on each gel as a molecular size standard. The extraction of DNA, the PCR and the electrophoresis were repeated twice on different days.

3. RESULTS AND DISCUSSION

Campylobacter jejuni and *C. coli* together, accounts for more than 95% of human campylobacteriosis (LASTOVICA and SKIRROW, 2002). Differentiation of *C. coli* and *C. jejuni* is essential for antibiotic treatment of infection as observed in case of erithromycin which is commonly used to treat *C. jejuni* infection. *C. coli* strains are most likely to be resistant to this antibiotic (CLOAK and FRATAMICO, 2002). The accurate identification and discrimination between these two species are also important in food microbiological analysis especially in epidemiological and for risk assessment studies.

The multiplex PCR assay was developed in this study to identify and discriminate *C. jejuni* and *C. coli* on the basis of genes *mapA* and *ceuE*. A PCR assay based on the *mapA* gene that allow specific identification of *C. jejuni* was previously described by Stucki et al. (1995) and Cheng and Griffiths (2003). Gonzalez et al. (1997) developed a sensitive and specific PCR assay using primers to *ceuE* that generated bands with different sizes (793bp and 894bp) for rapid identification and discrimination of *C. coli* and *C. jejuni*.

The PCR developed in the present study was also specific for differentiation of these two closely related *Campylobacter* species. The PCR amplicons were consistent and of the expected molecular sizes of 202 and 889-bp for read and ease distinguish of *C. jejuni* and *C. coli*, respectively (Fig. 1). The results suggest that the amplified sequences are conserved in both strains. The specificity was 100% and all other non-*Campylobacter* strains tested were found to be negative by multiplex PCR assay.

The detection of pathogenic bacteria in food by PCR frequently requires the prior enrichment of samples, since the extraction of bacterial DNA is not reliable for low contamination levels. Although increasing the time of analysis, the enrichment brings benefits such as differentiation between viable and unviable cells and repair of injured ones. The inoculum of approximately 10^4 CFU/ml or g of food obtained with non-selective and/or selective enrichment is sufficient to ensure the PCR sensitivity (MALORNY et al., 2009).

The use of selective enrichment was fundamental in the present study to encouraging the growth of *Campylobacter* spp., enhances the detection limit, prevents growth of non-*Campylobacter* species and dilutes inhibitory substances and unviable cells.

Chicken skin samples artificially contaminated with approximately 50 CFU of *C. jejuni* or *C. coli* per 10-g of samples were detected by the developed multiplex PCR after 48 h of enrichment. However, the adoption of new methods requires validation by application to naturally contaminated samples and comparison of the results with conventional culture which is considered the gold standard method. In this study, the developed multiplex PCR assay was tested with 28 chicken carcasses samples bought in supermarkets of Londrina, Paraná, Brazil. Thirteen samples (46.4%) were contaminated with *C. jejuni* and generated a 202-bp product in the multiplex PCR. Two samples were simultaneous contaminated with *C. jejuni* and *C. coli* (Fig. 2). *Campylobacter* were not isolate and not specific PCR products were observed in any negative samples after 48 h enrichment.

The major obstacle to the development of PCR to detect pathogenic microorganisms in foods is the presence of PCR inhibitors. Some food components and/or chemicals used for the selective enrichment of *Campylobacter* can influence the PCR efficiency due to the presence of inhibitors such as proteases, DNase, polysaccharides, fats, calcium salts and others (AL-SOUD and RADSTROM, 2000; AL-SOUD and RADSTROM, 2001; WILSON, 1997). These PCR inhibition factors must be removed to achieve the expected specificity and sensitivity. Therefore, after the enrichment of food samples, the bacteria must be separated from the food matrix and the inhibitors removed so that the bacterial DNA can be extracted and used in the PCR. The substances most commonly used for this purpose are Triton X-100, Tween 20 and betaine (AL-SOUD and RADSTROM, 2000).

Although there are several commercial kits for DNA purification, their high cost makes routine use in quality control laboratories difficult, especially in developing countries like Brazil. DNA extraction by boiling using Triton X-100 used in this study is an alternative to reduce costs without losing efficiency, as has already been shown in other studies (OLIVEIRA et al., 2005a; OLIVEIRA et al., 2005b; ESPÍÑEIRA et al., 2010).

Several multiplex PCR assays to detect *Campylobacter* spp. in fecal samples have been published (Houng et al., 2001; Wesley et al., 2000; Persson and Olsen, 2005). However, few studies using multiplex PCR to detect and differentiate *C. jejuni* and *C. coli* in foods have been reported (WINTERS and SLAVIK, 2000).

Multiplex PCR assay developed in this study allowed rapid detection and simultaneous differentiation of *C. jejuni* and *C. coli* in naturally and artificially

contaminated chicken skin samples. The detection time was reduced to 48 h, instead of over a week for the conventional culture method. It is recognized that only a limited number of samples were analyzed in this study, but the results suggest that the method could be suitable for a relatively rapid routine testing of chicken carcasses.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for providing a fellowship to Kérley Braga Pereira Bento Casaril and Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) and Fundação Araucária for financial support.

REFERENCES

- Al-Soud, W.A., & Radstrom, P. (2000). Effects of amplification facilitators on diagnostic PCR in the presence of blood, feces, and meat. *Journal of Clinical Microbiology*, 38, 4463-4470.
- Al-Soud, W.A., & Radstrom, P. (2001). Purification and characterization of PCR-inhibitory components in blood cells. *Journal of Clinical Microbiology*, 39, 485-493.
- Altekruse, S.F., Stern, N.J., Fields, P.I., & Swerdlow, D.L. (1999). *Campylobacter jejuni* - an emerging foodborne pathogen. *Emerging Infectious Diseases*, 5, 28-35.
- Altekruse, S.F., Swerdlow, D.L., & Stern, N.J. (1998). *Campylobacter jejuni*. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 14, 31-40.
- Cheng, Z., & Griffiths, M.W. (2003). Rapid detection of *Campylobacter jejuni* in chicken rinse water by melting-peak analysis of amplicons in real-time polymerase chain reaction. *Journal of Food Protection*, 66, 1343-1352.
- Cloak, O.M., & Fratamico, P.M. (2002). 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*, 65, 266-273.
- Corry, J.E.L., Post, D.E., Colin, P., & Laisney, M.J. (1995). Culture media for the isolation of campylobacters. *International Journal of Food Microbiology*, 26, 43-76.
- Debruyne, L., Samyn, E., Brandt, E., Vandenberg, O., Heyndrickx, M., & Vandamme, P. (2008). Comparative performance of different PCR assay for the identification of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Research in Microbiology*, 159, 88-93.
- Dedieu, L., Pagès, J.M., & Bolla, J.M. (2004). Use of *omp50* gene for identification of *Campylobacter* species by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 42, 2301-2305.
- Denis, M., Soumet, C., Rivoal, K., Ermel, G., Blivet, D., Salvat, G., & Colin, P. (1999). Development of a m-PCR assay for simultaneous identification of *Campylobacter jejuni* and *C. coli*. *Letters in Applied Microbiology*, 29, 406-410.
- Espiñeira, M., Atanassova, M., Ieites, J.M., & Santaclara, F.J. (2010). Validation of a method for the detection of five species, serogroups, biotypes and virulence factors of *Vibrio* by multiplex PCR in fish and seafood. *Food Microbiology*, 27, 122-131.
- Franchin, P.R., Aidoo, K.E., & Batista, C.R.V. (2005). Sources of poultry meat contamination with thermophilic *Campylobacter* before slaughter. *Brazilian Journal of Microbiology*, 36, 157-162.
- Giesendorf, B.A.J., & Quint, W.G.V. (1995). Detection and identification of *Campylobacter* spp. using the polymerase chain reaction. *Cellular and Molecular Biology*, 41, 625-638.
- Gonzalez, I., Grant, K.A., Richardson, P.T., Park, S.F. & Collins, M.D. (1997). Specific identification of the enteropathogens *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by using a PCR test based on the *ceuE* gene encoding a putative virulence determinant. *Journal of Clinical Microbiology*, 35, 759-763.

- Gorkiewicz, G., Feierl, G., Schober, C., Dieber, F., Kofer, J., & Zechner, R. (2003). Species-specific identification of *campylobacters* by partial 16S rRNA gene sequencing. *Journal of Clinical Microbiology*, 41, 2537–2546.
- Hong, B.X., Jiang, L.F., Hu, Y.S., Fang, D.Y., & Guo, H.Y. (2004). Application of oligonucleotide array technology for the rapid detection of pathogenic bacteria of foodborne infections. *Journal of Microbiological Methods*, 58, 403–411.
- Houng, H.S.H., Sethabutr, O., Nirdnoy, W., Katz, D.E.P., & Pang, L.W. (2001). Development of a *ceuE*-based multiplex polymerase chain reaction (PCR) assay for direct detection and differentiation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in Thailand. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 40, 11-19.
- Hussain, I., Mahmood, M.S., Akhtar, M., & Khan, A. (2007). Prevalence of *Campylobacter* species in meat, milk and other food commodities in Pakistan. *Food Microbiology*, 24, 219-222.
- Jorgensen, F., Bailey, R., Williams, S., Henderson, P., Wareing, D.R.A., Bolton, F.J., Frost, J.A., Ward, L., & Humphrey, T.J. (2002). Prevalence and numbers of *Salmonella* and *Campylobacter* spp. on raw, whole chickens in relation to sampling methods. *International Journal of Food Microbiology*, 76, 151–164.
- Jothikumar, N., Wang, X., & Griffiths, M.W. (2003). Real-time multiplex SYBR Green I-based PCR assay for simultaneous detection of *Salmonella* serovars and *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, 66, 2141-2145.
- Lastovica, A. J., & Skirrow, M. B. (2002). Clinical significance of *Campylobacter* and related species other than *C. jejuni* and *C. coli*. In I. Nachamkin, & M. J. Blaser (Eds.), *Campylobacter* (pp. 89-120). Washington, D.C: American Society for Microbiology
- Malorny, B., Huehn, S., Dieckmann, R., Kramer, N., & Helmuth, R. (2009). Polymerase chain reaction for rapid detection and seovar identification of *Salmonella* in food and feeding stuff. *Food Analytical Methods*, 2, 81-95.
- Maziero, M.T., & Oliveira, T.C.R.M. (2010). Effect of refrigeration and frozen storage on the *Campylobacter jejuni* recovery from naturally contaminated broiler carcasses. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41, 501-505.
- Mead, G.C. (2004). Microbiological quality of poultry meat: a review. *Revista Brasileira Ciência Avícola*, 6, 135-142.
- Nayak, R., Stewart, T.M., & Nawaz, M.S. (2005). PCR identification of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* by partial sequencing of virulence genes. *Molecular and Cellular Probes*, 19, 187–193.
- O’Sullivan, N.A., Fallon, R., Carroll, C., Smith, T., & Mehar, M. (2000). Detection and differentiation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in broiler chicken samples using PCR/DNA probe membrane based colorimetric assay. *Molecular and Cellular Probes*, 14, 7–16.
- Oliveira, T.C.R.M., Barbut, S., & Griffiths, M.W. (2005a). A robotic DNA purification protocol and real-time PCR for the detection of *Campylobacter jejuni* in foods. *Journal of Food Protection*, 68, 2131-2135.

- Oliveira, T.C.R.M., Barbut, S., & Griffiths, M.W. (2005b). Detection of *Campylobacter jejuni* in naturally contaminated chicken skin by melting peak analysis of amplicons in real-time PCR. *International Journal of Food Microbiology*, 104, 105-111.
- On, S.L.W., & Jordan, P.J. (2003). Evaluation of 11 PCR assays for species-level identification of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Journal of Clinical Microbiology*, 41, 330-336.
- Persson, S., & Olsen, K.E.P. (2005). Multiplex PCR for identification of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* from pure cultures and directly on stool samples. *Journal of Medical Microbiology*, 54, 1043-1047.
- Salloway, S., Mermel, L.A., Seamans, M., Aspinall, G.O., Nam Shin, J.E., Kurjanczyk, L.A., & Penner, J.L. (1996). Miller-Fisher Syndrome associated with *Campylobacter jejuni* bearing lipopolysaccharide molecules that mimic human ganglioside GD3. *Infection and Immunity*, 64, 2945-2949.
- Snelling, W.J., Matsuda, M., Moore, J.E., & Dooley, J.S.G. (2005). Under the microscope: *Campylobacter jejuni*. *Letters in Applied Microbiology*, 41, 297-302.
- Stucki, U., Frey, J., Icolet, J., & Burnens, A.P. (1995). Identification of *Campylobacter jejuni* on the basis of a species-specific gene that encodes a membrane protein. *Journal of Clinical Microbiology*, 33, 855-859.
- Thomas, C., Gibson, H., Hill, D.J., & Mabey, M. (1999) *Campylobacter* epidemiology: an aquatic perspective. *Journal of Applied Microbiology*, 85, 168S-177S.
- Totten, P.A., Patton, C.M., Tenover, F.C., Barrett, T.J., Stamm, W.E., Steigerwalt, A.G., Lin, J.Y., Holmes, K.K., & Brenner D.J. (1987). Prevalence and characterization of hippurate-negative *Campylobacter jejuni* in King County, Washington. *Journal of Clinical Microbiology*, 25, 1747-1752.
- Uyttendale, M., de Troy, P., & Debevere, J. (1999). Incidence of *Salmonella*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* and *Listeria monocytogenes* in poultry carcasses and different types of poultry products for sale on the Belgian retail market. *Journal of Food Protection*, 62, 735-740.
- Wang, X., Jothikumar, N., & Griffiths, M.W. (2004). Enrichment and DNA extraction protocols for the simultaneous detection of *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* in raw sausage meat with multiplex Real-time PCR. *Journal of Food Protection*, 67, 189-192.
- Wesley, I.V., Wells, S.J., Harmon, K.M., Green, A., Schroeder-Tucker, L., Glover, M., & Siddique, I. (2000). Fecal shedding of *Campylobacter* and *Arcobacter* spp. in dairy cattle. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 1994-2000.
- Wilson, I.G. (1997). Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 3741-3751.
- Winters, D.K., & Slavik, M.F. Multiplex PCR detection of *Campylobacter jejuni* and *Arcobacter butzleri* in food products. (2000). *Molecular and Cellular Probes*, 14, 95-99.
- Zhao, C., Ge, B., De Villena, J., Sudler, R., Yeh, E., Zhao, S., White, D.G., Wagner, D., & Meng, J. (2001). Prevalence of *Campylobacter* spp., *Escherichia coli*, and *Salmonella* serovars in retail chicken, turkey, pork, and beef from the Greater Washington, D.C., area. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 5431-5436.

Table 1 – Bacterial strains included in this study

Bacterium	Source	Number of Strains tested
<i>Campylobacter jejuni</i>	UEL ^a	06
<i>Campylobacter jejuni</i>	LACEN ^b	01
<i>Campylobacter jejuni</i>	FIOCRUZ ^c	01
<i>Campylobacter jejuni</i>	IB ^d	01
<i>Campylobacter coli</i>	FIOCRUZ ^c	01
<i>Campylobacter coli</i>	IB ^d	01
<i>Salmonella</i> Enteritidis	UEL ^a	01
<i>Salmonella</i> Typhimurium	UEL ^a	01
<i>Salmonella</i> Typhi	UEL ^a	01
<i>Salmonella</i> Infantis	UEL ^a	01
<i>Salmonella</i> Montevideo	UEL ^a	01
<i>Salmonella</i> Agona	UEL ^a	01
<i>Salmonella</i> Dublin	UEL ^a	01
<i>Salmonella</i> Newport	UEL ^a	01
<i>Citrobacter freundii</i>	UEL ^a	01
<i>Enterobacter aerogenes</i> ,	UEL ^a	01
<i>Enterobacter cloacae</i>	UEL ^a	01
<i>Morganella morganii</i>	UEL ^a	01
<i>Escherichia coli</i>	UEL ^a	01
<i>Shigella sonnei</i>	UEL ^a	01
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	UEL ^a	01
<i>Bacillus cereus</i>	UEL ^a	01
<i>Proteus mirabilis</i>	UEL ^a	01
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	UEL ^a	01
<i>Staphylococcus aureus</i>	UEL ^a	01
<i>Bacillus subtilis</i>	UEL ^a	01
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	UEL ^a	01
<i>Lactobacillus casei</i>	UEL ^a	01

^a UEL, Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brazil.

^b LACEN, Laboratório Central do Estado do Paraná, Paraná, Brazil.

^c FIOCRUZ, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil.

^d IB, Instituto Biológico, São Paulo, Brazil.

Table 2 – Primers used in this study

Target	Primer-direction	Primer sequence (5'-3')	Size of amplified DNA sequence (bp)
<i>mapA</i> gene	Forward	AGT CCT GGT GGT TTT GAA GC	202 bp ^a
	Reverse	CCG CAT TAA AAT TCA CAT CG	
<i>ceuE</i> gene	Forward	ATG AAA AAA TCT TTA GTT TTT GCA	889bp ^b
	Reverse	ATT TTA TTA TTT GTA GCA GCG	

^aCHENG and GRIFFITHS (2003)

^bNAYAK et al. (2005)

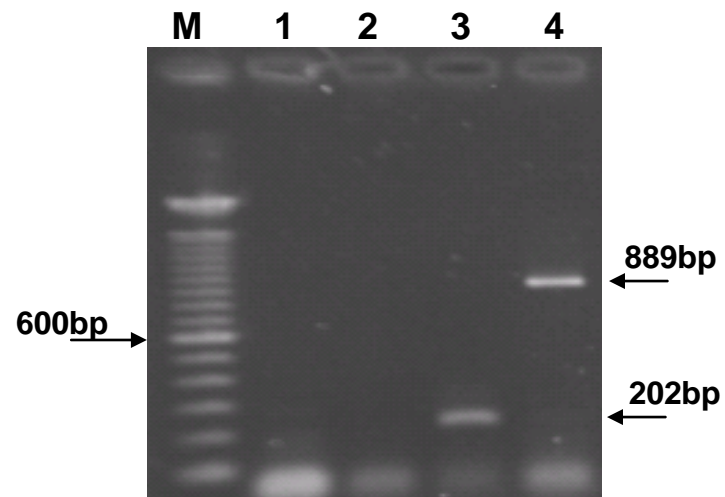


Fig. 1. Multiplex PCR assay for simultaneous detection of *C. jejuni* (202 bp) and *C. coli* (889 bp) in pure culture. Lane 1, blank; lane 2, *Salmonella* Enteritidis negative controls; lanes 3 and 4, *C. jejuni* and *C. coli* positive controls, respectively; lane M=100 bp molecular marker.

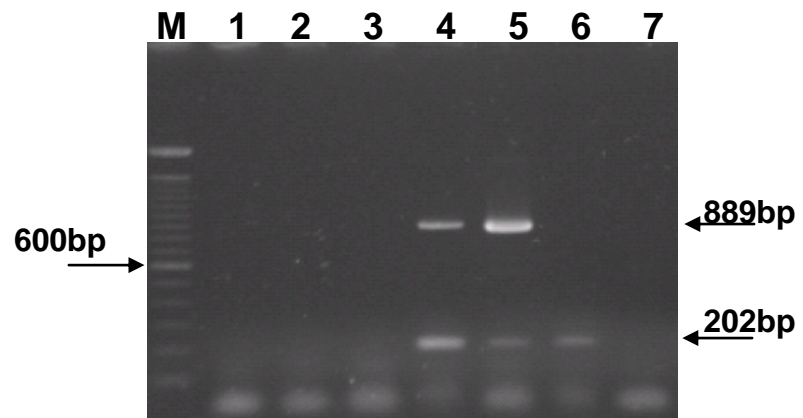


Fig. 2. Electrophoretic profile obtained through PCR multiplex of chicken carcasses. Lane 1, blank ; lanes 2-7 samples chicken skin; lane M=100 bp molecular marker.

ARTIGO 2: Padronização de PCR em Tempo Real para Quantificação de *Campylobacter jejuni*

**Kérley Braga Pereira Bento Casaril^{1,2}; Gislayne Trindade Vilas-Bôas³;
Francismar Corrêa Marcelino⁴; Tereza Cristina Rocha Moreira de Oliveira²**

¹Universidade Estadual do Oeste do Paraná, UNIOESTE, Campus de Francisco Beltrão

²Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Londrina, UEL

³Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Londrina, UEL

⁴Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA Soja Londrina

1. INTRODUÇÃO

Campylobacter spp. é uma das causas mais frequentes de gastroenterite bacteriana em vários países (QUINN, 1997) e *C. jejuni* é a espécie mais associada à campilobacteriose humana nos países desenvolvidos, seguida por *C. coli* (FRIEDMAN et al., 2000; NACHAMKIN, 2001).

Campylobacter spp. são comumente isoladas de diversos alimentos, incluindo carne de porco (EPLING et al., 1993), carne bovina (HÄNNINEN, 1981), leite cru (FAHEY et al., 1995) e aves (KRAMER et al., 2000) sendo o frango e seus derivados o principal veículo transmissor ao homem (RIVOAL et al., 2005). *Campylobacter* geralmente está presente em baixa densidade celular e pode tornar-se injuriado em alimentos e água. Portanto, entrar em um estado viável, mas não cultivável (VBNC) devido à diminuição de nutrientes e do estresse físico (HUMPHREY, 1986; ROLLINS e COLWELL, 1986; JONES et al., 1991; BEUMER et al., 1992; MEDEMA et al., 1992).

Os métodos convencionais de isolamento e identificação de *Campylobacter* em alimentos são complexos, trabalhosos e demorados (WISESSOMBAT et al., 2009). Estes métodos incluem pré-enriquecimento, enriquecimento seletivo, plaqueamento em ágar seletivo diferencial e identificação fenotípica com testes bioquímicos e sorológicos que requerem um mínimo de cinco dias (YANG-CHIH SHIH, 2000). Além disso, propriedades fenotípicas pelas quais as bactérias são identificadas nem sempre são expressas, e quando isso ocorre dificultam a interpretação dos resultados e, conseqüentemente a sua classificação (MALORNY et al., 2003).

Diante da necessidade de testes rápidos, específicos e sensíveis, para a identificação e quantificação de microrganismos que não expressam suas propriedades fenotípicas e/ou estão em estado VBNC, métodos moleculares, como a reação em cadeia da polimerase (PCR), têm sido padronizados para detecção e identificação de *Campylobacter* em alimentos. Inúmeros ensaios utilizando PCR convencional já foram descritos para a identificação e a caracterização de *Campylobacter* a partir de amostras, incluindo fezes (LINTON et al., 1997; HOUNG et al., 2001, MAHER et al.,

2003; PERSSON e OLSEN, 2005), produtos alimentícios (WINTERS e SLAVIK, 2000) e culturas (WANG et al., 2002; FERMER e ENGVALL, 1999), usando uma variedade de genes alvos tais como *omp50*, *rRNA 23S*, *rRNA 16S*, *flaA*, *hipO*, *glyA*, *mapA*, *ceuE* e *cadF* (GIESENDORF e QUINT, 1995; DENIS et al., 1999; KONKEL et al., 1999; AL RASHID et al., 2000; WASSENAAR e NEWELL, 2000; BANG et al., 2002; DEDIEU, 2003; ON e JORDAN, 2003; GORKIEWICZ et al., 2003; NAYAK et al., 2005).

No entanto, muitos dos ensaios de PCR padronizados para a identificação de *Campylobacter* necessitam de eletroforese em gel de agarose para detecção do produto, demandando tempo e mão-de-obra, além de apresentar interpretação subjetiva em alguns casos e baixa sensibilidade. Por essas razões, métodos baseados em PCR em tempo real (SAILS et al., 2003; LAGIER et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2005b; CHURRUCÁ et al., 2007) estão sendo desenvolvidos e propostos para o diagnóstico rápido e sensível da detecção e quantificação de *Campylobacter* spp. em diversos alimentos (YANG et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2005b; RÖNNER e LINDMARK et al., 2007). Estes métodos eliminam a necessidade de manipular produtos de PCR, após amplificação, reduzindo assim o risco de resultados falso-positivos causados por contaminações subsequentes (WITTEWER et al., 2001; IEVEN, 2007).

Uma característica importante dos métodos baseados em PCR em tempo real é a possibilidade de detectar e quantificar patógenos difíceis de serem cultivados por métodos tradicionais de cultura. Além disso, métodos de PCR em tempo real podem dispensar o enriquecimento das amostras permitindo rápida detecção e quantificação de patógenos por análise direta de amostras de alimentos (AHMED et al., 2009).

Rosenquist et al. (2003) observaram que a diminuição das contagens em carcaças de frango tem impacto na incidência de campilobacteriose humana. Assim, métodos de enumeração de *Campylobacter* em carne de frango e em outros alimentos podem ser aplicados em estudos de avaliação de risco, assim como, para estabelecer padrões de contagem para a indústria de alimentos.

O objetivo deste estudo foi desenvolver um ensaio de PCR em tempo real específico capaz de detectar e quantificar *Campylobacter jejuni* em culturas puras para a sua posterior utilização na quantificação de *Campylobacter* em carne de frango.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 *Isolados Bacterianos e Condições de Cultivo*

Um total de 09 isolados de *C. jejuni*, dois (02) isolados de *C. coli*, um (01) isolado de *Salmonella* Enteritidis e um (01) isolado de *Escherichia coli* foram incluídos neste estudo (Tabela 1).

Tabela 1 – Isolados bacterianos incluídos neste estudo.

Bactéria	Local de isolamento	Número de isolados testados
<i>Campylobacter jejuni</i>	UEL ^a	06
<i>Campylobacter jejuni</i>	LACEN ^b	01
<i>Campylobacter jejuni</i>	FIOCRUZ ^c	01
<i>Campylobacter jejuni</i>	IB ^d	01
<i>Campylobacter coli</i>	FIOCRUZ ^c	01
<i>Campylobacter coli</i>	IB ^d	01
<i>Salmonella</i> Enteritidis	UEL ^a	01
<i>Escherichia coli</i>	UEL ^a	01

^a UEL, Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil.

^b LACEN, Laboratório Central do Estado do Paraná, Paraná, Brasil.

^c FIOCRUZ, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil.

^d IB, Instituto Biológico, São Paulo, Brasil.

Os isolados de *Campylobacter* foram cultivados em caldo Bolton (CM0983, Oxoid, Cambridge, UK) a 37 °C por 48 h sob condições de microaerofilia (5% O₂, 10% CO₂, 85% N₂), criado com o sistema microaerofílico Probac (Probac, Santa Cecília, São Paulo, Brasil). *Salmonella* Enteritidis e *Escherichia coli* foram cultivadas em caldo BHI (Acumedia, Lansing, Michigan, E.U.A.) a 37 °C por 24 h.

2.2 *Extração de DNA*

Para a extração de DNA genômico, alíquotas de 1 mL de suspensões bacterianas proveniente de culturas puras foram centrifugadas a 16.000 × g por 10 min. Os sedimentos foram lavados duas vezes com água peptonada tamponada (Acumedia, Lansing, Michigan E.U.A.) e ressuspensos com 200 µl de solução esterilizada de Triton X-100 (Nuclear) a 1%. As suspensões foram homogeneizadas, submetidas à fervura em banho-maria por 10 min. Após rápido resfriamento em banho

de gelo por 5 min e centrifugação a $16.000 \times g$ por 5 min. O DNA genômico presente no sobrenadante foi quantificado em espectrofotômetro Nano Drop.

2.3 *qPCR em Tempo Real*

As reações da qPCR em tempo real foram realizadas utilizando iniciadores desenvolvidos a partir da seqüência do gene *mapA* de *C. jejuni*, denominados mapA(F) 5'AGT CCT GGT GGT TTT GAA GC 3' e mapA(R) 5'CCG CAT TAA AAT TCA CAT CG 3' (CHENG e GRIFFITHS, 2003). As amplificações por PCR em tempo real foram realizadas em triplicada, em um volume final de 25 μ L contendo 8,0 μ L de água Ultra pura; 0,5 μ L de ROX (referência passiva); 12,5 μ L de SYBR® Green qPCR SuperMix UDG (Invitrogen), 400 nmol do par de iniciadores *mapA* (Invitrogen) e 100 ng de DNA obtido a partir de culturas puras das linhagens empregadas neste estudo (Tabela 01). As condições de reação foram 50 °C durante 2 minutos, 95 °C durante 10 minutos e 40 repetições de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto. Em todas as reações de PCR, utilizou-se como controle positivo amostras de DNA de *C. jejuni* (isolado Instituto Biológico) e como controle negativo água ultrapura esterilizada.

Como normalizador foram desenvolvidos iniciadores para o gene *cytB* de *Gallus gallus*. Para tanto a seqüência do gene foi obtida do *GenBank* (AF028795.1) e exportada para o programa Primer Express v 3.3 (Applied Biosystems). Os iniciadores *cytB*(F) 5'CCCGATTCTTCGCTTTACACTT 3' e *cytB*(R) 5'CGTGTAGGAAGGTGAGGTGGAT 3' foram selecionados seguindo critérios padronizados definidos pelo software.

O valor de Ct (*threshold cycle*) foi determinado usando o programa SDS Detector (Applied Biosystems). A eficiência de amplificação (E) foi calculada a partir da curva padrão pela equação: $E = (10^{-1/\text{slope}} - 1)$ utilizando uma série de diluições do DNA alvo (10^{-1} a 10^{-6}). Após o término da quantificação, para verificar a formação de dímeros de iniciadores, amplificações inespecíficas, possíveis erros e contaminações, realizou-se a curva de dissociação.

A molécula intercalante SYBR Green emite fluorescência que é determinada ao final de cada ciclo da PCR. O “cycle treshold” (Ct) é definido como o número do ciclo nos quais a reação inicia a sua fase exponencial de amplificação, cruzando o “threshold” (limiar) que é definido pela linha de início de sinais gerados. Em todas as reações foi utilizado o corante ROX como referência passiva, o qual normaliza a fluorescência presente no meio e a fluorescência do repórter.

Foi realizado um gel de eletroforese dos produtos amplificados na PCR em tempo real visando confirmar a especificidade dos iniciadores para os genes *mapA* e *cytB*.

2.4 Construção dos Padrões de Calibração

Para construção dos padrões de calibração da qPCR, o DNA foi preparado a partir de 1×10^9 UFC mL⁻¹ de *C. jejuni* pelo método de Flamm et al. (1984). A quantificação do DNA foi feita por espectrofotometria (Nano Drop) e as amostras de DNA diluídas serialmente de forma a se obter amostras com DNA variando entre 1 e 10^6 cópias do genoma da bactéria. A massa de uma cópia do genoma bacteriano foi determinada pela equação $M = n \times (1.799063,1 \times 10^{-21} \text{ gbp}^{-1})$ com n como o número total de pares de base (pb), que para *Campylobacter* foi considerado como sendo 1.641.481 bp (PARKHILL et al., 2000). O mesmo procedimento foi repetido com amostras de DNA de *G. gallus*, cujo genoma apresenta $1,2 \times 10^9$ pares de base (HILLIER et al., 2004).

Para construção da curva de calibração os valores de delta Ct [$\Delta\text{Ct} = \text{Ct} (\text{gene alvo}) - \text{Ct} (\text{controle endógeno})$] foram plotados em função do logaritmo do número de cópias de cada padrão. A qualidade das curvas foi determinada pelos valores de R^2 e índice de inclinação da reta.

3. RESULTADOS

3.1 Especificidades do Ensaio PCR em Tempo Real

O gene *mapA* de *C. jejuni* codifica uma proteína de membrana espécie-específica denominada MAPA (STUCKI et al., 1995). Iniciadores desenvolvidos a partir da sequência do gene *mapA* de *C. jejuni*, anteriormente testados por Cheng e Griffiths (2003) foram escolhidos como alvo para a detecção e quantificação de *C. jejuni* em culturas puras utilizando a metodologia de qPCR em tempo real empregando SYBR Green. Como normalizador foram desenvolvidos iniciadores para o gene *cytB* de *G. gallus*.

Os iniciadores para os genes *mapA* escolhidos, permitem a amplificação de um fragmento de 202 pb específico para todas as linhagens testadas de *C. jejuni*. O mesmo fragmento não foi detectado quando empregadas amostras de DNA de outras espécies, incluindo linhagens de *C. coli*, *Salmonella* Enteritidis e *Escherichia coli* (Figura 1). Semelhantemente, o par de iniciador *cytB*, utilizado como normalizador, permitiu a amplificação de um fragmento de 78 pb específico para as amostras de DNA genômico de *G. gallus*. Também não foi detectado nenhum fragmento quando amostra de DNA das bactérias testadas neste estudo foram empregadas nas reações de qPCR utilizando o iniciador *cytB*, o que demonstra a alta especificidade dos pares de iniciadores desenhados.

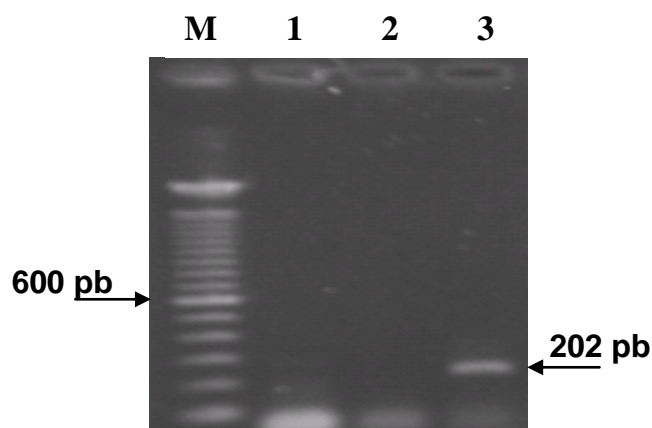


Figura 1. Perfil eletroforético dos produtos de PCR convencional para detecção de *C. jejuni* (202 pb). 1 - Branco; 2 - *Salmonella* Enteritidis (controle negativo); 3 - *C. jejuni* (controle positivo); M=marcador de peso molecular (100 pb).

Durante a reação da PCR, além dos produtos de interesse, outros produtos de PCR podem ser formados, especialmente dímeros de iniciadores. A especificidade do par de iniciadores foi analisada pela curva de dissociação gerada após a reação de PCR em tempo real (Figura 2). O pico da curva ocorreu na temperatura de dissociação de 76,3° C correspondendo a um único fragmento. A análise das curvas de dissociação após cada corrida de PCR em tempo real não revelaram outro pico, indicando que os iniciadores produziram apenas o fragmento de PCR esperado.

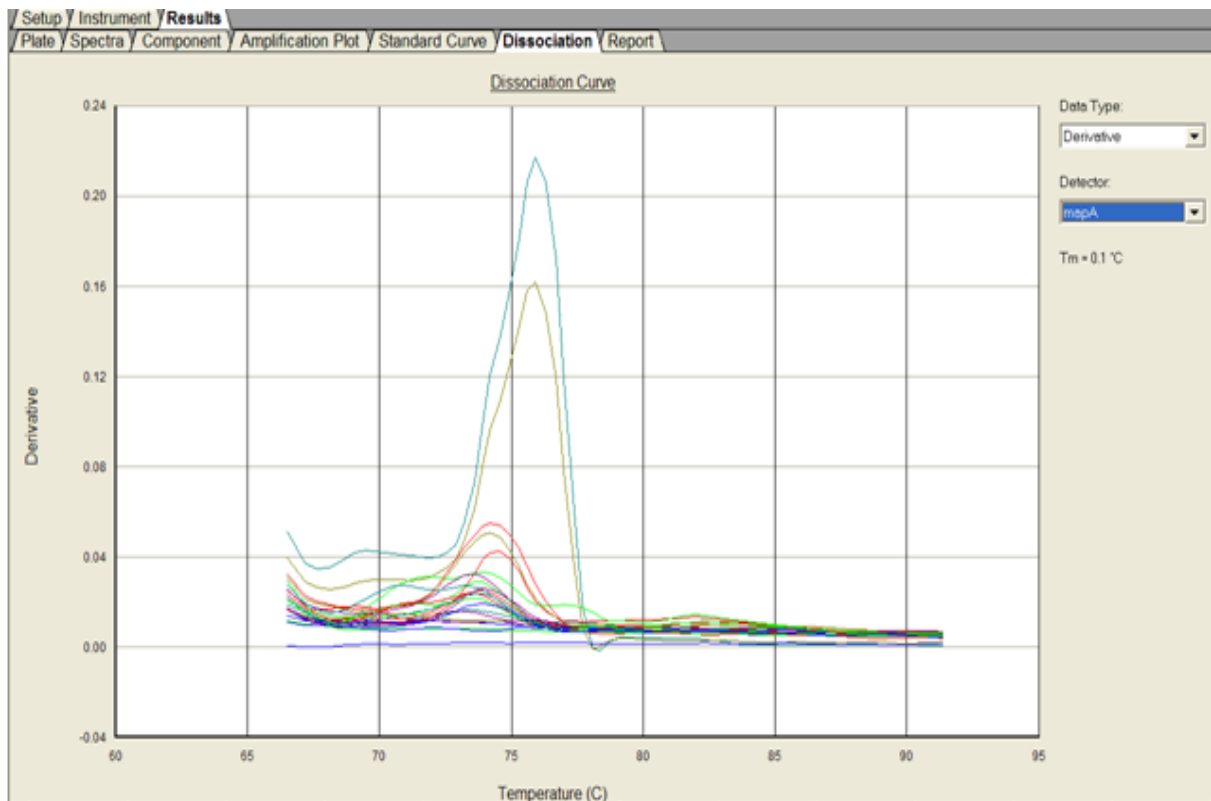


Figura 2. Curva de dissociação dos produtos resultantes da amplificação por PCR em tempo real de amostras de DNA de culturas puras de *C. jejuni*.

Os produtos da reação de PCR em tempo real foram submetidos à eletroforese em gel de agarose confirmando a amplificação do gene alvo pela geração de um único produto de tamanho compatível com o esperado e a ausência de formação de produtos inespecíficos (Figura 3).

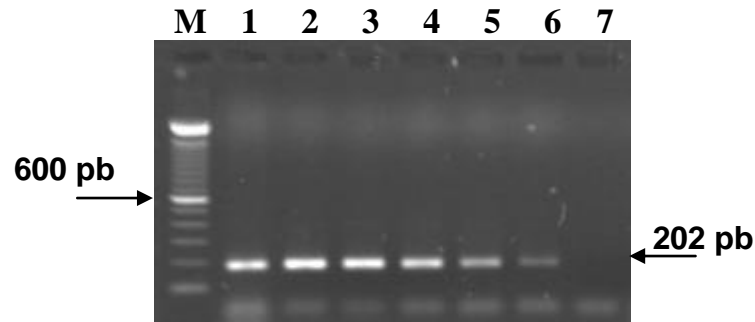


Figura 3. Perfil eletroforético dos produtos de qPCR em tempo real para detecção de *C. jejuni* (202 pb). 1 – DNA total; 2 a 7 - Diluição seriada do DNA alvo de *C. jejuni* (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6}); M=marcador de peso molecular (100 pb).

3.2 Eficiência do Ensaio PCR em Tempo Real

O sistema de qPCR em tempo real permite a determinação da quantidade absoluta de uma sequência alvo de ácido nucléico de uma amostra desconhecida. Para tanto, faz-se necessário confeccionar uma curva padrão com quantidades pré-estabelecidas do ácido nucléico. Os valores obtidos pela qPCR das amostras desconhecidas são comparadas aos valores da curva padrão e tendo como base a equação da curva é possível quantificar o ácido nucléico de amostras desconhecidas. Livak e Schmittgen (2001) afirmam que a quantificação absoluta determina o número de cópias de um alvo de interesse relacionando o sinal emitido pela PCR com os dados fornecidos pela curva padrão.

Para avaliar a eficiência de amplificação do gene alvo e do normalizador, diluições seriadas do DNA alvo obtidas de culturas puras de *C. jejuni* variando de 10^{-1} a 10^{-6} e do DNA de *G. gallus* (10^{-1} a 10^{-6}) foram testadas e os resultados da reação, dados pelo valor de Ct foram tabelados para o cálculo da equação de regressão e do R-quadrado. As equações de regressão obtidas estão apresentadas na Figura 2 e mostram boas condições de amplificação e correlação positivas entre as variáveis. Os resultados indicaram que a eficiência ($E = (10^{-1/\text{slope}} - 1)$) foi de 99% para o gene alvo e 103% para o normalizador. As curvas utilizadas para calcular os valores das eficiências podem ser observadas na Figura 2. A linearidade das curvas padrões e o fato de que a PCR opera com eficiência constante confirma que o ensaio foi bem adaptado para medidas quantitativas de *C. jejuni*.

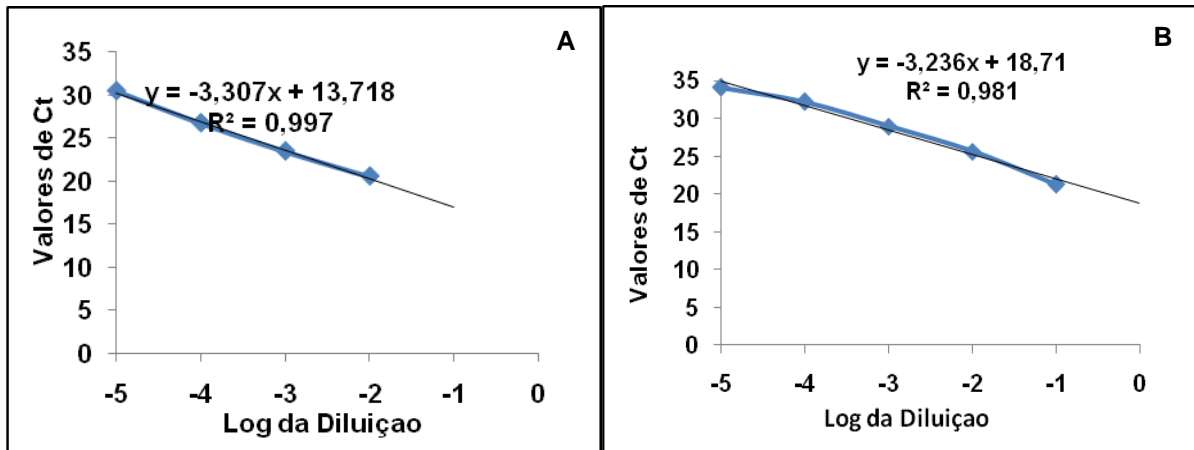


Figura 2 – Determinação da eficiência da PCR em tempo real para o gene alvo *mapA* e para o gene normalizador *cytB*. As amostras do DNA genômico de *C. jejuni* e *G. gallus* foram diluídas serialmente 6X e as diferentes diluições foram amplificadas para o gene alvo e para o gene normalizador. Os valores de Ct foram plotados em função do logaritmo da diluição. O eixo y corresponde aos valores de Ct e o eixo x log da diluição. Gráfico A. Estimativa da eficiência do gene alvo *mapA* com slope = -3,307. B - Estimativa da eficiência do gene normalizador com slope = -3,236.

4. DISCUSSÃO

A necessidade do desenvolvimento de métodos rápidos, sensíveis, econômicos, de fácil utilização e interpretação para detecção específica de *C. jejuni* envolvendo matrizes complexas tais como alimentos é fundamental para o controle do microrganismos e estudo epidemiológico da campilobacteriose. Neste sentido, os métodos moleculares como a PCR em tempo real têm sido utilizados para detecção, identificação, diferenciação de espécies de *Campylobacter* spp. e quantificação em alimentos (CHENG e GRIFFITHS, 2003; OLIVEIRA et al., 2005b).

O corante SYBR Green foi utilizado na PCR em tempo real para a detecção e quantificação de *C. jejuni*. Embora as sondas sequencias-específicas e o corante SYBR Green apresentem limite de detecção, reprodutibilidade e sensibilidade comparáveis, a detecção utilizando o SYBR Green foi escolhida por ser mais econômica para aplicação em ensaios de PCR em tempo real simplex (DEPREZ et al., 2002; VILALTA et al., 2002, WILHELM et al., 2003).

O limite de detecção da qPCR no presente ensaio foi estimado em cerca de uma cópia por PCR para culturas bacterianas de *C. jejuni*. Resultados semelhantes também foram obtidos por Yang et al. (2003) ao utilizaram SYBR Green I e LigttCycler System para detectarem *C. jejuni* em meios de cultura. Debretsion et al. (2007) utilizando a metodologia TaqMan, ao construírem as curvas padrões do DNA mostraram que o limite de detecção para o ensaio de PCR em tempo real foi de 1 UFC para culturas puras. Chen et al. (1997) utilizando a metodologia TaqMan observaram um limite de detecção de duas unidades formadoras de colônia (UFC) por reação de PCR, quando cultura pura de *S. typhimurium* foi usado. Cheng e Griffiths (2003) utilizando SYBR Green para a detecção de *C. jejuni* em cultura pura por PCR em tempo real obtiveram o limite de detecção de $5,2 \times 10^2$ UFC/mL.

O ensaio qPCR em tempo real desenvolvido neste estudo mostrou ser rápido, sensível e específico e reduziu significativamente o tempo necessário para a detecção e quantificação de *C. jejuni* em culturas puras. Entretanto, em testes preliminares, não foi possível detectar *Campylobacter* sem o prévio enriquecimento das amostras de carne de frango artificialmente ou naturalmente contaminadas (dados não

apresentados). A PCR é um ensaio sensível, porém substâncias inibidoras comumente presentes em matrizes alimentares podem levar a redução do limite de detecção do ensaio ou subestimar a contagem das bactérias presentes. Assim sendo, para detecção e quantificação de *Campylobacter* empregando o ensaio PCR padronizado no presente estudo será necessário testar métodos de concentração e purificação de DNA a partir da carne de frango. Alguns métodos de purificação de DNA disponíveis comercialmente (YANG et al., 2003; THAKUR e GEBREYES, 2005; BONJOCH et al., 2009), assim como, a concentração do DNA por precipitação com etanol empregada por Rönner e Lindmark (2007) poderiam ser utilizados para possibilitar a quantificação direta de *Campylobacter* em carne de frango. A metodologia de filtração do enxágüe da carne de frango descrita por Botteldoorn et al. (2008) poderia também ser uma alternativa viável e eficaz.

Vários estudos mostram que os veículos mais importantes de transmissão de *Campylobacter* para o ser humano são produtos de origem avícola contaminados. A redução na contagem de *Campylobacter* em carcaças de frango pode significativamente reduzir o número de casos de campilobacteriose humana (ROSENQUIST et al., 2003; WINGSTRAND et al., 2006). Um estudo de avaliação microbiológica de risco mostrou a possibilidade de redução de 60%, 78% e 97% dos casos de campilobacteriose na Bélgica pela redução de 1, 2 e 3 log na contagem de *Campylobacter* nas carcaças de frango, respectivamente (BOTTELDOORN et al., 2008). Portanto, a padronização de ensaios PCR em tempo real para a quantificação de *Campylobacter* em alimentos é essencial para o controle deste patógeno.

A enumeração direta de *Campylobacter* em carne de frango pode ser muito útil para a determinação da contagem inicial em abatedouros. A rapidez, especificidade, sensibilidade e a possibilidade de quantificação da PCR em tempo real tornam essa técnica a mais promissora atualmente conhecida.

No entanto, ainda há várias limitações e a técnica ainda não é considerada confiável quando a amostra de alimento não enriquecida apresenta resultado negativo.

CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo mostram a possibilidade de quantificar *Campylobacter jejuni* em cultura pura por PCR em tempo real e indicam a potencialidade do ensaio ser aplicado para quantificar essa bactéria patogênica em alimentos.

AGRADECIMENTO

As autoras são gratas à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por fornecer bolsa para Kérley Braga Pereira Bento Casaril; ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) e a Fundação Araucária pelo apoio financeiro e a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Soja de Londrina) pela infra-estrutura laboratorial.

REFERÊNCIAS

- Ahmed W; Sawant S; Huygens F; Goonetilleke A; Gardner T. Prevalence and occurrence of zoonotic bacterial pathogens in surface waters determined by quantitative PCR. *Water Research*, 43: 4918-4928, 2009.
- Al Rashid ST; Dakuna I; Louie H; Ng D; Vandamme P; Johnson W; Chan VL. Identification of *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis*, *Arcobacter butzleri*, and *A. butzleri*-like species based on the *glyA* gene. *J. Clin. Microbiol.*, 38(4):1488-1494, 2000.
- Bang DD; Wedderkopp A; Pedersen K; Madsen M. Rapid PCR using nested primers of the 16S rRNA and the hippuricase (*hipO*) genes to detect *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in environmental samples. *Mol. Cell. Probes*, 16:359–369, 2002.
- Beumer RR; de Vries J; Rombouts FM. *Campylobacter jejuni* non-culturable coccoid cells. *Int. J. Food Microbiol.* 15:153–163, 1992.
- Bonjoch X; Calvó L; Soler M; Ruiz-Rueda O; Garcia-Gil LJ. A new multiplexed real-time PCR assay to detect *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, and *C. upsaliensis*. *Food Anal. Methods*, 3:40-46, 2010.
- Botteldoorn N; Van Coillie E; Piessens, V, Rasschaert G; Debruyne L; M. Heyndrickx. Quantification of *Campylobacter* spp. in chicken carcass rinse by real-time PCR. *J. Appl. Microbiol.*, 105:1909-1918, 2008.

- Chen S; Yee A; Griffiths M; Larkin C; Yamashiro CT; Behari R; Paszko-Kolva C; Rahn K; DeGrandis SA. The evaluation of a fluorogenic polymerase chain reaction assay for the detection of *Salmonella* species in food commodities. *Int. J. Food Microbiol.*, 35:239-50, 1997.
- Cheng Z; Griffiths MW. Rapid detection of *Campylobacter jejuni* in chicken rinse water by melting-peak analysis of amplicons in real-time polymerase chain reaction. *J. Food Prot.*, 66:1343-52, 2003.
- Churrua E; Girbau C; Martinez I; Mateo E; Alonso R; Fernández-Astorga. Detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in chicken meat samples by real-time nucleic acid sequence-based amplification with molecular beacons. *Int. J. Food Microbiol.*, 117(1):85-90, 2007.
- Debretson A; Habtemariam T; Wilson S; Nganwa D; Yehualaeshet T. Real-time PCR assay for rapid detection and quantification of *Campylobacter jejuni* on chicken rinses from poultry processing plant. *Mol. Cell. Probes*, 21:177-181, 2007.
- Dedieu L; Pagès JM; Bolla JM. Use of *omp50* gene for identification of *Campylobacter* species by PCR. *J. Clin. Microbiol.*, 42:2301-05, 2004.
- Denis M; Soumet C; Rivoal K; Ermel G; Blivet D; Salvat G; Colin P. Development of a m-PCR assay for simultaneous identification of *Campylobacter jejuni* and *C. coli*. *Lett Appl Microbiol.*, 29:406-10, 1999.
- Deprez RHL; Fijnvandraat AC; Ruijter JM; Moorman AFM. Sensitivity and accuracy of quantitative real-time polymerase chain reaction using SYBR green I depends on cDNA synthesis conditions. *Anal. Biochem.*, 307:63–69, 2002.
- Epling LK; Carpenter JA; Blankenship LC. Prevalence of *Campylobacter* spp and *Salmonella* spp on pork carcasses and the reduction effected by spraying with lactic acid. *J. Food Prot.*, 56: 536-537, 1993.
- Fahey T; Morgan D; Gunneburg C; Adak GK; Majid F; Kaczmarek E. An outbreak of *Campylobacter jejuni* enteritis associated with failed milk pasteurisation. *J. Infect.*, 31:137-143, 1995.
- Fermer C; Engvall EO. Specific PCR identification and differentiation of the thermophilic *Campylobacters*, *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, and *C. upsaliensis*. *J. Clin. Microbiol.* 37:3370–3373, 1999.
- Flamm RK; Hinrichs DJ; Thomashow MF Introduction of pAM beta 1 into *Listeria monocytogenes* by conjugation and homology between native *L. monocytogenes* plasmids. *Infect. Immun.* 44:157–161, 1984.
- Friedman CR; Neimann J; Wegener HC; Tauxe RV. Epidemiology of *Campylobacter jejuni* infections in the United States and other industrialized nations. In: Nachamkin I; Blaser MJ. (Eds). *Campylobacter*, 2nd ed. Washington, DC:ASM Press, 2000. p. 121-138.
- Giesendorf BAJ; Quint WGV. Detection and identification of *Campylobacter* spp. using the polymerase chain reaction. *Cell. Mol. Biol.*, 41:625–38, 1995.

- Gorkiewicz G; Feierl G; Schober C; Dieber F; Kofer J; Zechner R et al., Species-specific identification of *Campylobacters* by partial 16S rRNA gene sequencing. *J. Clin. Microbiol.*, 41:2537–46, 2003.
- Hänninen ML. Survival of *Campylobacter jejuni coli* in ground refrigerated and in ground frozen beef liver and in frozen broiler carcasses. *Acta Vet. Scand.*, 22:566-577, 1981.
- Hillier LW; Miller W; Birney, E, et al., Sequence and comparative analysis of the chicken genome provide unique perspectives on vertebrate evolution *Nature*, 432:695:716, 2004.
- Houng HSH; Sethabutr O; Nirdnoy W; Katz DEP; Pang LW. Development of a *ceuE*-based multiplex polymerase chain reaction (PCR) assay for direct detection and differentiation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in Thailand. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 40:11-19, 2001.
- Humphrey TJ. Techniques for the optimum recovery of cold injured *Campylobacter jejuni* from milk or water. *J. Appl. Bacteriol.* 61:125–132, 1986.
- Ieven M. Currently used nucleic acid amplification tests for the detection of viruses and atypicals in acute respiratory infections. *J. Clin. Virol.*, 40:259-276, 2007.
- Jones DM; Sutcliffe EM; Curry A. recovery of viable but non-culturable *Campylobacter jejuni*. *J. Gen. Microbiol.*, 137:2477-2482, 1991.
- Konkel ME; Gray SA; Kim BJ; Garvis SG; Yoon J. Identification of the enteropathogens *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* based on the *cadF* virulence gene and its product *J. Clin. Microbiol.*, 37 (3): 510-517, 1999.
- Kramer JM; Frost JA; Bolton FJ; Wareing DRA. *Campylobacter* contamination of raw meat and poultry at retail sale: identification of multiple types and comparison with isolates from human infections. *J. Food Prot.*, 63:1654-1659, 2000.
- LaGier MJ; Joseph LA; Passaretti TV; Musser KA; Cirino, NM. A real-time multiplexed PCR assay for rapid detection and differentiation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Mol. Cell. Probes*, 18:275-282, 2004.
- Linton D; Lawson AJ; Owen RJ, Stanley J. PCR detection, identification to species level, and fingerprinting of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* direct from diarrheic samples. *J. Clin. Microbiol.*, 35: 2568–2572, 1997.
- Livak KJ; Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Method. *Methods*, 25:402-408, 2001.
- Maher M; Finnegan C; Collins E; Ward B; Carroll C; Cormican M. Evaluation of culture methods and a DNA probe-based PCR assay for detection of *Campylobacter* species in clinical specimens of feces. *J. Clin. Microbiol.* 41:2980–2986, 2003.
- Malorny B; Tassios, PT; Radstrom P; Cook N; Wagner, M; Hoorfar J. Standardization of diagnostic PCR for the detection of foodborne pathogens *Int. J. Food Microbiol.*, 83:39-48, 2003.

- Medema GJ; Schets FM; van de Giessen AW; Havelaar AH. Lack of colonization of 1 day old chicks by viable, non-culturable *Campylobacter jejuni*. *J. Appl. Bact.* 72:512–516, 1992.
- Nachamkin I. *Campylobacter* Enteritis and the Guillain-Barré Syndrome. *Curr. Infect. Dis. Rep.*, 3:116-122, 2001.
- Nayak R, Stewart TM, Nawaz MS. PCR identification of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* by partial sequencing of virulence genes. *Mol. Cell. Probes*, 19:187–93. 2005.
- Oliveira TCRM; Barbut S; Griffiths MW. Detection of *Campylobacter jejuni* in naturally contaminated chicken skin by melting peak analysis of amplicons in real-time PCR. *Int. J. Food. Microbiol.*, 104: 105-111, 2005b.
- On SLW; Jordan PJ. Evaluation of 11 PCR assays for species-level identification of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *J. Clin. Microbiol.*, 41:330-36. 2003.
- Parkhill J; Wren BW; Mungall K; Ketley JM; Churcher C; Basham D; Chillingworth T; Davies RM; Feltwell T; Holroyd S; Jagels K; Karlyshev AV; Moule S; Pallen MJ; Penn CW; Quail MA; Rajandream MA; Rutherford KM; van Vliet AH; Whitehead S; Barrell BG. The genome sequence of the food-borne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals hypervariable sequences. *Nature*, 403:665-668, 2000.
- Persson S; Olsen KEP. Multiplex PCR for identification of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* from pure cultures and directly on stool samples. *J. Med. Microbiol.*, 54:1043–47, 2005.
- Quinn TC. Editorial response: Diversity of *Campylobacter* species and its impact on patients infected with human immunodeficiency virus. *Clin. Infect. Dis.* ,24:1114-1117, 1997.
- Rivoal K; Ragimbeau C; Salvat G, Colin P; Ermel G. Genomic diversity of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* isolates recovered from free-range broiler farms and comparison with isolates of various origins. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71(10): 6216-6227, 2005.
- Rollins DM; Colwell RR. Viable but nonculturable stage of *Campylobacter jejuni* and its role in survival in the natural aquatic environment. *Appl. Environ. Microbiol.*, 52:531–538. 1986.
- Rönner AC; Lindmark H. Quantitative detection of *Campylobacter jejuni* on fresh chicken carcasses by real-time PCR. *J. Food Prot.*; 70:1373-78, 2007.
- Rosenquist H; Nielsen NL; Sommer HM; Norrung B; Christensen BB. Quantitative risk assessment of human campylobacteriosis associated with thermophilic *Campylobacter* species in chickens. *Int. J. Food Microbiol.*, 83:87-103, 2003.
- Sails AD; Fox AJ; Bolton FJ; Wareing DRA; Greenway DLA. A real-time PCR assay for the detection of *Campylobacter jejuni* in foods after enrichment culture. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69:1383–1390, 2003.

- Stucki U; Frey J; Icolet J; Burnens AP. Identification of *Campylobacter jejuni* on the basis of a species-specific gene that encodes a membrane protein. *J. Clin. Microbiol.*, 33(4):855-59, 1995.
- Thakur S; Gebreyes WA. *Campylobacter coli* in swine production: antimicrobial resistance mechanisms and molecular epidemiology. *J. Clin. Microbiol.*, 43: 5705–5714, 2005.
- Vilalta A; Whitlow V; Martin T. Real-time PCR determination of *Escherichia coli* genomic DNA contamination in plasmid preparations. *Anal. Biochem.*, 301:151–153, 2002.
- Wang GH; Clark CG; Taylor TM; Pucknell C; Barton C; Price L; Woodward DL; Rodgers FG. Colony multiplex PCR assay for identification and differentiation of *Campylobacter jejuni*, *C.-coli*, *C.-lari*, *C.-upsaliensis*, and *C.-fetus* subsp *fetus*. *J. Clin. Microbiol.*, 40:4744-4747, 2002.
- Wassenaar TM; Newell; DG. Genotyping of *Campylobacter* spp. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66(1):1-9. 2000.
- Wilhelm J; Pingoud A; Hahn M. Real-time PCR-based method for the estimation of genome sizes. *Nucleic Acids Res.*, 31:1-6, 2003.
- Wingstrand A; Neiman J; Engberg J; Nielsen EM; Gerner-Smidt P; Wegener HC; Molbalk, K. Fresh chicken as main risk factor for campylobacteriosis, Denmark. *Emerg. Infect. Dis.*, 12:280-285, 2006.
- Winters DK; Slavik MF. Multiplex PCR detection of *Campylobacter jejuni* and *Arcobacter butzleri* in food products. *Mol. Cell. Probes*, 14: 95–99, 2000.
- Wisessombat S; Kittiniyom K; Srimanote P; Wonglumsom W; Voravuthikunchai SP. A novel method and simple apparatus for the detection of thermophilic *Campylobacter* spp. in chicken meat products. *J. Microbiol. Methods* 76:169–173, 2009.
- Wittwer CT; Herrmann MG; Gundry CN; Elenitoba-Johnson KSJ. Real-Time Multiplex PCR Assays. *Methods*, 25:430-442, 2001.
- Yang C; Jiang Y; Huang K; Zhu C; Yin Y. Application of real-time PCR for quantitative detection of *Campylobacter jejuni* in poultry, milk and environmental water. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 38:265-271, 2003.
- Yang-Chih Shih D. Isolation and identification of enteropathogenic *Campylobacter* spp. from chicken samples in Taipei. *J. Food Protect.*, 63:304– 308, 2000.

ARTIGO 3: Detecção de *Campylobacter jejuni* em Carcaças de Frango por PCR em Tempo Real

**Kérley Braga Pereira Bento Casaril^{1,2}; Gislayne Trindade Vilas-Bôas³;
Francismar Corrêa Marcelino⁴; Tereza Cristina Rocha Moreira de Oliveira²**

¹Universidade Estadual do Oeste do Paraná, UNIOESTE, Campus de Francisco Beltrão

²Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Londrina, UEL

³Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Londrina, UEL

⁴Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA Soja Londrina

1 INTRODUÇÃO

Campylobacter jejuni é a principal causa de gastroenterite bacteriana em vários países (TAUXE, 1997; ALTEKRUSE et al., 1999; FRIEDMAN et al., 2000). As aves, especialmente frangos, são os principais reservatórios naturais de *Campylobacter*. Evidências epidemiológicas sugerem que outros animais, tais como, aves silvestres, suínos, cães, gatos, ovelhas e bovinos (SKIRROW, 1991; STERN, 1992; JONES et al., 1984; WORKMAN et al., 2005) possam ser portadores de estirpes patogênicas para os seres humanos.

A carne de frango e seus derivados são os principais veículos transmissores de *Campylobacter* spp. ao homem (KRAMER et al., 2000; RIVOAL et al., 2005). Embora *Campylobacter* spp. sejam comumente isoladas de vários alimentos, incluindo carne de porco (EPLING et al., 1993), carne bovina (HÄNNINEN, 1981) e leite cru (FAHEY et al., 1995), a água não tratada (JONES e ROWORTH, 1996) e o leite contaminado (HEUVELINK et al., 2009) têm sido responsáveis por grandes surtos de campilobacteriose.

A dose infectante é muito pequena; estima-se que cerca de 500 células de *C. jejuni* podem causar doenças em humanos (ROLLINS e COLWELL, 1986; BLACK et al., 1998), indicando que mesmo um pequeno número de células de *Campylobacter* em alimentos ou em água pode apresentar potencial risco à saúde.

Os métodos convencionais para detecção de *Campylobacter* spp. em alimentos envolvem o cultivo do microrganismo em meios seletivos a 42 °C em condições de microaerofilia (ENDTZ et al., 1991), seguido da identificação dos isolados de acordo com suas características morfológicas, bioquímicas e imunológicas, um processo que é complexo, trabalhoso e demorado (WISESSOMBAT et al., 2009), requer um mínimo de cinco dias para obtenção dos resultados (YANG-CHIH SHIH, 2000; COX et al., 2007) e muitas vezes a identificação fenotípica de *Campylobacter* spp. é difícil de ser interpretada (ON, 2001). Além disso, bactérias estressadas e/ou viáveis, mas não cultiváveis (VBNC), podem não crescer em meios de cultura seletivos (ROLLINS e COLWELL, 1986; JONES et al., 1991).

Nos últimos anos, numerosos estudos têm sido realizados para desenvolver ou avaliar métodos rápidos para a detecção de *Campylobacter* spp. (CLOAK et al., 2001; WICKER et al., 2001; HONG et al., 2003). Métodos moleculares como a reação de amplificação em tempo real, uma variante da reação de PCR convencional têm sido padronizados para detecção, identificação e quantificação de *Campylobacter* em diversas amostras incluindo culturas puras (YANG et al., 2004), fezes humanas e de animais (LUND e MADSON, 2006; INGLIS e KALISCHUK, 2004; LAGIER et al., 2004; RUDI et al., 2004; LIN et al., 2008), água (AHMED et al., 2009) e alimentos (CHENG e GRIFFITHS, 2003; SAILS et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2005ab; RÖNNER e LINDMARK, 2007; BOTTELDOORN et al., 2008), usando uma variedade de genes alvo tais como *mapA*, *cadF*, *ceuE*, rDNA 16S, VS1 (LUND e MADSON, 2000; BEST et al., 2003; CHENG e GRIFFITHS, 2003; OLIVEIRA et al., 2005ab; YANG et al., 2004; AHMED et al., 2009).

Os métodos de PCR em tempo real eliminam a necessidade de manipular produtos de PCR, após amplificação, reduzindo assim o risco de resultados falso-positivos causados por contaminação cruzada entre fragmentos e amostras subsequentes (WITTWER et al., 2001, IEVEN, 2007).

O objetivo deste estudo foi desenvolver um ensaio de PCR em tempo real, rápido e específico capaz de detectar *Campylobacter jejuni* em carcaças de frango. O ensaio foi testado com carcaças de frango artificialmente e naturalmente contaminadas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 *Isolados Bacterianos e Condições de Cultivo*

Um total de 09 isolados de *C. jejuni*, dois (02) isolados de *C. coli*, um (01) isolado de *Salmonella* Enteritidis e um (01) isolado de *Escherichia coli* foram incluídos neste estudo (Tabela 1).

Tabela 1 – Isolados bacterianos incluídos neste estudo.

Bactéria	Local de isolamento	Número de isolados testados
<i>Campylobacter jejuni</i>	UEL ^a	06
<i>Campylobacter jejuni</i>	LACEN ^b	01
<i>Campylobacter jejuni</i>	FIOCRUZ ^c	01
<i>Campylobacter jejuni</i>	IB ^d	01
<i>Campylobacter coli</i>	FIOCRUZ ^c	01
<i>Campylobacter coli</i>	IB ^d	01
<i>Salmonella</i> Enteritidis	UEL ^a	01
<i>Escherichia coli</i>	UEL ^a	01

^a UEL, Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil.

^b LACEN, Laboratório Central do Estado do Paraná, Paraná, Brasil.

^c FIOCRUZ, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil.

^d IB, Instituto Biológico, São Paulo, Brasil.

Os isolados de *Campylobacter* foram cultivados em caldo Bolton (CM0983, Oxoid, Cambridge, UK) a 37 °C por 48 h sob condições de microaerofilia (5% O₂, 10% CO₂, 85% N₂), criado com o sistema microaerofílico Probac (Probac, Santa Cecília, São Paulo, Brasil). *Salmonella* Enteritidis e *Escherichia coli* foram cultivadas em caldo BHI (Acumedia, Lansing, Michigan, E.U.A.) a 37 °C por 24 h.

2.2 *Extração de DNA*

Para a extração de DNA genômico, alíquotas de 1 mL de suspensões bacterianas proveniente de culturas puras foram centrifugadas a 16.000 × g por 10 min. Os sedimentos foram lavados duas vezes com água peptonada tamponada (Acumedia, Lansing, Michigan E.U.A.) e ressuspensos com 200 µl de solução esterilizada de Triton X-100 (Nuclear) a 1%. As suspensões foram homogeneizadas, submetidas à fervura em banho-maria por 10 min. Após rápido resfriamento em banho

de gelo por 5 min e centrifugação a $16.000 \times g$ por 5 min. O DNA genômico presente no sobrenadante foi quantificado em espectrofotômetro Nano Drop.

2.3 *qPCR em Tempo Real*

As reações da qPCR em tempo real foram realizadas utilizando iniciadores desenvolvidos a partir da seqüência do gene *mapA* de *C. jejuni*, denominados mapA(F) 5'AGT CCT GGT GGT TTT GAA GC 3' e mapA(R) 5'CCG CAT TAA AAT TCA CAT CG 3' (CHENG e GRIFFITHS, 2003). As amplificações por PCR em tempo real foram realizadas em triplicada, em um volume final de 25 μ L contendo 8,0 μ L de água Ultra pura; 0,5 μ L de ROX (referência passiva); 12,5 μ L de SYBR® Green qPCR SuperMix UDG (Invitrogen), 400 nmol do par de iniciadores *mapA* (Invitrogen) e 100 ng de DNA obtido a partir de culturas puras das linhagens empregadas neste estudo (Tabela 01). As condições de reação foram 50 °C durante 2 minutos, 95 °C durante 10 minutos e 40 repetições de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto. Em todas as reações de PCR, utilizou-se como controle positivo amostras de DNA de *C. jejuni* (isolado Instituto Biológico) e como controle negativo água ultrapura esterilizada.

Como normalizador foram desenvolvidos iniciadores para o gene *cytB* de *Gallus gallus*. Para tanto a seqüência do gene foi obtida do *GenBank* (AF028795.1) e exportada para o programa Primer Express v 3.3 (Applied Biosystems). Os iniciadores *cytB*(F) 5'CCCGATTCTTCGCTTTACACTT 3' e *cytB*(R) 5'CGTGTAGGAAGGTGAGGTGGAT 3' foram selecionados seguindo critérios padronizados definidos pelo software.

O valor de Ct (*threshold cycle*) foi determinado usando o programa SDS Detector (Applied Biosystems). A eficiência de amplificação (E) foi calculada a partir da curva padrão pela equação: $E = (10^{-1/\text{slope}} - 1)$ utilizando uma série de diluições do DNA alvo (10^{-1} a 10^{-6}). Após o término da quantificação, para verificar a formação de dímeros de iniciadores, amplificações inespecíficas, possíveis erros e contaminações, realizou-se a curva de dissociação.

A molécula intercalante SYBR Green emite fluorescência que é determinada ao final de cada ciclo da PCR. O “cycle treshold” (Ct) é definido como o número do ciclo nos quais a reação inicia a sua fase exponencial de amplificação, cruzando o “threshold” (limiar) que é definido pela linha de início de sinais gerados. Em todas as reações foi utilizado o corante ROX como referência passiva, o qual normaliza a fluorescência presente no meio e a fluorescência do repórter.

Foi realizado um gel de eletroforese dos produtos amplificados na PCR em tempo real visando confirmar a especificidade dos iniciadores para os genes *mapA* e *cytB*.

2.4 Construção dos Padrões de Calibração

Para construção dos padrões de calibração da qPCR, o DNA foi preparado a partir de 1×10^9 UFC mL⁻¹ de *C. jejuni* pelo método de Flamm et al. (1984). A quantificação do DNA foi feita por espectrofotometria (Nano Drop) e as amostras de DNA diluídas serialmente de forma a se obter amostras com DNA variando entre 1 e 10^6 cópias do genoma da bactéria. A massa de uma cópia do genoma bacteriano foi determinada pela equação $M = n \times (1.799063,1 \times 10^{-21} \text{ gbp}^{-1})$ com n como o número total de pares de base (pb), que para *Campylobacter* foi considerado como sendo 1.641.481 bp (PARKHILL et al., 2000). O mesmo procedimento foi repetido com amostras de DNA de *G. gallus*, cujo genoma apresenta $1,2 \times 10^9$ pares de base (HILLIER et al., 2004).

Para construção da curva de calibração os valores de delta Ct [$\Delta\text{Ct} = \text{Ct} (\text{gene alvo}) - \text{Ct} (\text{controle endógeno})$] foram plotados em função do logaritmo do número de cópias de cada padrão. A qualidade das curvas foi determinada pelos valores de R^2 e índice de inclinação da reta.

2.5 Avaliação de Amostras Artificialmente Contaminadas

Amostras de frango compradas em supermercado locais da cidade de Londrina, Paraná foram analisadas quanto à presença de *Campylobacter jejuni*. De

cada carcaça foi retirada, assepticamente uma amostra de 10g de pele. As amostras foram colocadas em sacos plásticos esterilizados, misturadas com 10 mL de caldo Bolton e homogeneizadas em "Stomacher 400" (Seward, Worthing, Inglaterra) por 1 min. Alíquotas de 5 mL da água de rinsagem foram adicionadas a 45 mL de caldo Bolton contendo suplemento seletivo (SR0208E, Oxoid), incubadas a 37 °C por 3 h, e em seguida a 42 °C por 45 h em condições de microaerofilia. Após a incubação, alíquotas de 0,1 mL de caldo de enriquecimento foram inoculadas em placas de Ágar Bolton contendo suplemento seletivo e as placas de cultura foram incubadas em microaerofilia a 37 °C por 48 h. A identificação presuntiva de *Campylobacter* spp. foi baseada na morfologia da colônia, coloração de Gram e teste de hidrólise do hipurato.

As amostras de pele de frangos negativas para *Campylobacter* foram inoculadas com *C. jejuni* (isolado Instituto Biológico) para a obtenção de células viáveis totais em cerca de 1, 10 ou 50 UFC/10g de pele de frango. As análises microbiológicas das amostras de pele de frango inoculadas com *C. jejuni* foram realizadas conforme descrito anteriormente para as peles de frango não inoculadas.

2.6 Coleta e Preparado das Amostras de Pele de Frango

Dez carcaças congeladas de frangos adquiridas de supermercados locais foram examinadas. De cada carcaça foram retiradas, assepticamente três amostras de 10g de pele compostas de diferentes partes (cloaca, pescoço, peito e coxa). Cada amostra foi subdividida em três porções, acondicionada individualmente em saco plástico esterilizado, para *Stomacher*, sendo uma porção analisada imediatamente após armazenagem, a segunda após quatro (04) dias e a terceira após oito (08) dias de armazenamento.

2.7 Análise Molecular das Peles de Frango

Cada porção de 10 g de pele de frango foi misturada com 10 mL de caldo Bolton (CM0983, Oxoid) e agitada em "Stomacher 400" por 1 min. Alíquotas de 1 mL da água de rinsagem foram retiradas para avaliação em PCR em tempo real sem

extração do DNA e alíquotas de 5 mL de água de rinsagem foram adicionadas a 45 mL de caldo Bolton contendo suplemento seletivo e incubadas a 37 °C por 3 h, e, em seguida, 42 °C por 45 h sob condições de microaerofilia. Após 48 h de incubação, 2 mL de caldo de enriquecimento Bolton foram retirados. Uma alíquota de 1 mL foi guardada para avaliação por PCR em tempo real sem extração do DNA e uma alíquota de 1 mL foi utilizada para extração de DNA conforme descrito acima e utilizada para avaliação por PCR em tempo real. A análise microbiológica das amostras foi realizada concomitantemente à análise molecular conforme descrito no item 2.5.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Iniciadores desenvolvidos a partir da sequência do gene *mapA* de *C. jejuni* foram escolhidos como alvo para a detecção de *C. jejuni* em amostras de pele de frango. Semelhantemente, iniciadores desenvolvidos para o gene *cytB* de *G. gallus* foram utilizados como normalizador em todas as reações de PCR em tempo real. O gene normalizador foi utilizado com a finalidade de corrigir possíveis diferenças de concentrações de DNA empregada em cada reação, bem como variações decorrentes da pipetagem manual dos reagentes. Para controle negativo água ultrapura esterilizada foi utilizada em todas as reações e como controle positivo amostras de DNA de *C. jejuni* (isolado Instituto Biológico). Com a amplificação das sequências-alvo, os perfis de fluorescência gerados com os iniciadores foram medidos pelos sistemas de PCR em tempo real. Os resultados obtidos com os iniciadores para o gene *mapA* demonstram a amplificação de um fragmento de DNA apenas para amostras de DNA de *C. jejuni*. Da mesma forma, o par de iniciadores para o gene *cytB* de *G. gallus* permitiu amplificação apenas a partir de amostras de DNA desta espécie.

Para avaliar a eficiência de amplificação do gene alvo (*mapA*) e do normalizador (*cytB*) diluições seriadas do DNA de culturas puras de *C. jejuni* e de *G. gallus* variando de 10^{-1} a 10^{-6} foram testadas. Curvas padrões para as culturas puras geradas pela plotagem dos valores de Ct contra os valores da diluição foram construídas, sendo calculados a equação de regressão e o R-quadrado. As equações de regressão obtidas estão apresentadas na Figura 1 e apresentam boas condições de amplificação e correlação positivas entre as variáveis. Os resultados indicaram que a eficiência ($E = (10^{-1/\text{slope}} - 1)$) foi de 99% para o gene alvo e 103% para o normalizador. As curvas utilizadas para calcular os valores das eficiências podem ser observadas na Figura 1.

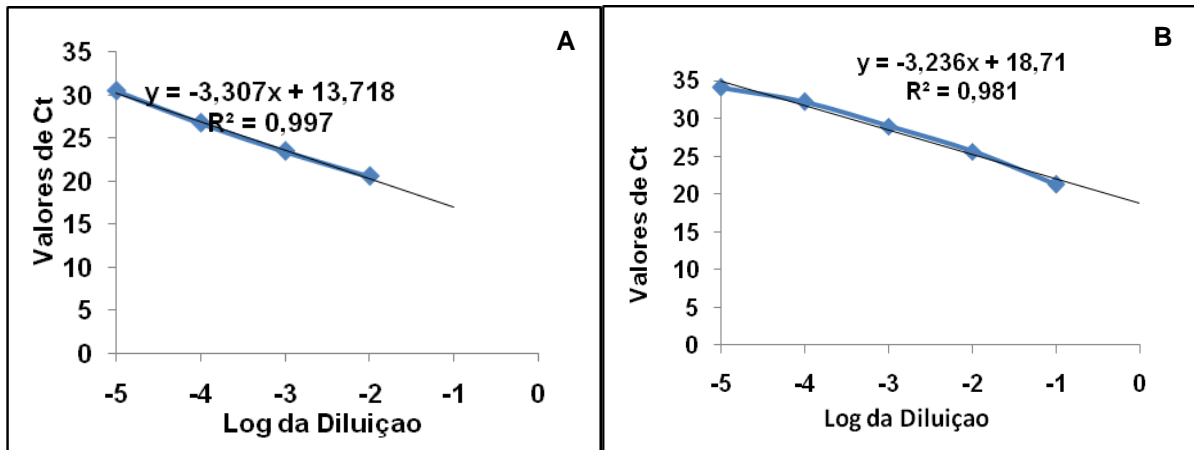


Figura 1 – Determinação da eficiência da PCR em tempo real para o gene alvo *mapA* e para o gene normalizador *cytB*. As amostras do DNA genômico de *C. jejuni* e *G. gallus* foram diluídas serialmente 6X e as diferentes diluições foram amplificadas para o gene alvo e para o gene normalizador. Os valores de Ct foram plotados em função do logaritmo da diluição. O eixo y corresponde aos valores de Ct e o eixo x log da diluição. Gráfico A. Estimativa da eficiência do gene alvo *mapA* com slope = -3,307. B - Estimativa da eficiência do gene normalizador com slope = -3,236.

A especificidade do par de iniciadores para o gene *mapA* de *C. jejuni* foi testado usando SYBR Green, resultando em uma reação específica para todas as linhagens testadas de *C. jejuni* que foram detectadas por fluorescência quando usado a PCR em tempo real. O mesmo fragmento não foi detectado quando empregadas amostras de DNA de outras espécies, incluindo linhagens de *C. coli*, *Salmonella Enteritidis* e *Escherichia coli*. Semelhantemente, quando o par de iniciador *cytB* foi testado quanto a sua especificidade resultou em reação específica para as amostras de DNA genômico de *G. gallus*. Também não foi detectado nenhum fragmento quando amostra de DNA das bactérias testadas neste estudo foram empregadas nas reações de PCR utilizando o iniciador *cytB*. Isto demonstra a alta especificidade dos pares de iniciadores desenhados.

Durante a reação da PCR, além dos produtos de interesse, outros produtos de PCR podem ser formados, especialmente dímeros de iniciadores. A especificidade do par de iniciadores foi analisada pela curva de dissociação gerada após a reação de PCR em tempo real. O pico da curva para o gene *mapA* ocorreu na temperatura de dissociação de 76,3° C e para o gene *cytB* o pico da curva foi observado na temperatura de 78,8° C, correspondendo a um único fragmento para ambos os genes. A análise das curvas de dissociação após cada corrida de PCR em tempo real não

revelaram outro pico, indicando que os iniciadores produziram apenas fragmentos específicos de PCR.

As mesmas condições de amplificação usadas para a PCR em tempo real, com o DNA de culturas puras, permitiu também a detecção e identificação de *C. jejuni* em amostras de pele de frango, artificialmente e naturalmente contaminadas, com isolados desta bactéria.

Resultados positivos em amostras de pele de frango artificialmente contaminada com cerca de 1, 10 e 50 UFC de *C. jejuni* por 10 g de amostra utilizada em ensaio de PCR em tempo real foram observados após 48h de enriquecimento quando o DNA foi extraído por fervura e usando 1% de Triton X-100.

Oliveira et al. (2005) também utilizando SYBR Green obteve resultados positivos em amostras de pele de frango contaminadas com aproximadamente 1 e 10 UFC por 25g de amostras após 24 h de enriquecimento. Em amostras contaminadas com aproximadamente 50 UFC de *C. jejuni* por 25g de amostras o tempo necessário para a obtenção de resultados positivos foi de 12 h de enriquecimento, ressaltando que todas as amostras do DNA bacteriano foram extraídas por fervura e usando 1% de Triton X-100.

Para aumentar a sensibilidade de uma técnica de detecção, o enriquecimento é usado normalmente para aumentar a concentração do patógeno alvo. No entanto, é impossível fazer uma estimativa da concentração inicial de patógenos presentes em amostras de alimentos após o enriquecimento e a quantificação das células não podem ser realizada (WANG et al., 2007).

As análises de contagem após 48 h de enriquecimento seletivo nas amostras de pele de frango congeladas apresentaram resultados positivos para 07 (sete) amostras das 10 analisadas e a contagem de células viáveis de *Campylobacter* variou entre $5,2 \times 10^2$ UFC/mL a $> 6,2 \times 10^5$ UFC/mL de caldo de enriquecimento (Tabela 2).

Tabela 2 – Detecção de *C. jejuni* em amostras de pele de frango congeladas, após 48 horas de enriquecimento das amostras.

Contagem de <i>C. jejuni</i> (UFC/mL)			
Amostras	Análise imediata	Análise após 4 dias	Análise após 8 dias
1	-	-	-
2	6×10^2	$5,4 \times 10^2$	$5,2 \times 10^2$
3	$1,3 \times 10^3$	$1,1 \times 10^3$	$1,0 \times 10^3$
4	$>6,1 \times 10^4$	$>5,5 \times 10^4$	$5,3 \times 10^3$
5	-	-	-
6	$>5,1 \times 10^5$	$>4,9 \times 10^5$	$4,7 \times 10^4$
7	$>6,2 \times 10^5$	$>1,2 \times 10^5$	$>1,3 \times 10^5$
8	$>5,3 \times 10^5$	$7,4 \times 10^4$	$7,2 \times 10^4$
9	$>3,9 \times 10^5$	$9,6 \times 10^4$	$7,3 \times 10^4$
10	-	-	-

Produtos de PCR específicos foram observados em todas as amostras analisadas através da técnica da PCR em tempo real, após 48h de enriquecimento seletivo quando o DNA foi extraído por fervura usando Triton X-100. Vários ensaios de PCR em tempo real para detectar *Campylobacter* spp. em amostras de alimentos foram relatados nos últimos anos. Sails et al. (2003) relataram a aplicação de ensaio qPCR para detecção de *C. jejuni* em alimentos naturalmente contaminados. O ensaio foi tão sensível quanto os métodos convencionais de cultivo e necessitou de enriquecimento seletivo por 48 horas para a obtenção de resultados positivos. Oliveira et al. (2005) analisando amostras de pele de frango naturalmente contaminadas isolaram *Campylobacter* e observaram produto de PCR específica para *C. jejuni* após 24 horas de enriquecimento seletivo.

Neste estudo foram necessárias 48 h de enriquecimento seletivo para a detecção de *C. jejuni* nas amostras de pele de frango. Houve uma redução significativa do tempo necessário para a detecção de *Campylobacter* quando comparados aos métodos convencionais que necessitam de 5 dias para a obtenção de resultados presuntivos. Debretson et al. (2007) avaliaram amostras de água de rinsagem de frango coletadas em três plantas de processamento de aves, em diferentes estágios de processamento. Após a coleta, as amostras foram cultivadas pelos métodos

convencionais, bem como tiveram seus DNAs extraídos e foram submetidos diretamente a PCR em tempo real, sem enriquecimento. O limite de detecção para o ensaio qPCR em tempo real foi de aproximadamente 10 equivalentes de genoma.

Verifica-se através da análise dos dados que a técnica de PCR em tempo real foi muito mais sensível na detecção de *C. jejuni* do que a contagem de células viáveis. Botteldoorn et al. (2008) ao quantificarem *Campylobacter* spp. em carcaças de frango na água de rinsagem por PCR em tempo real também detectaram maior quantidade de cópias de DNA do que células viáveis. A presença de *C. jejuni* viáveis, mas não cultiváveis ou morta (THOLOZAN et al., 1999) pode ser a razão para a subestimação, mas também a fragilidade e as dificuldades para enumerar *C. jejuni* pode ser a base para as diferenças observadas.

Embora vários kits comerciais para purificação de DNA estejam disponíveis, o custo dificulta o seu uso em laboratórios de rotina, principalmente, em países como o Brasil. A extração de DNA por fervura utilizando Triton X-100, utilizado no presente estudo, é uma alternativa para a redução de custos sem perda da eficiência, como já observado por outros autores (CHENG e GRIFFITHS, 2003; OLIVEIRA et al., 2005a; OLIVEIRA et al., 2005b; ESPÍNEIRA et al., 2010).

A partir deste estudo, podemos concluir que a técnica de PCR em tempo real é um método mais sensível, específico e rápido na detecção de *Campylobacter* em alimentos, se comparado as técnicas convencionais de cultivo, porém é válido destacar que a técnica apresenta limitações, uma vez que o método não distingue células viáveis de células mortas.

AGRADECIMENTO

As autoras são gratas à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por fornecer bolsa para Kérley Braga Pereira Bento Casaril, ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) e a Fundação Araucária pelo apoio financeiro e a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Soja de Londrina) pela infra-estrutura laboratorial.

REFERÊNCIAS

- Ahmed W; Sawant S; Huygens F; Goonetilleke A; Gardner T. Prevalence and occurrence of zoonotic bacterial pathogens in surface waters determined by quantitative PCR. *Water Research*, 43: 4918-4928, 2009.
- Altekruse SF; Stern NJ; Fields PI; Swerdlow DL. *Campylobacter jejuni* - an emerging foodborne pathogen. *Emerg. Infect. Dis.*; 5:28-35, 1999.
- Best EL; Powell EJ; Swift C; Grant KA; Frost JA. Applicability of a rapid duplex real-time PCR assay for speciation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* directly from culture plates. *FEMS Microbiol. Lett.* 229:237-241, 2003.
- Black RE; Levine MM; Clements ML; Hughes TP; Blaser J. Experimental *Campylobacter jejuni* infection in humans. *J. Infect. Dis.*, 157:472-479, 1998.
- Botteldoorn N; Van Coillie E; Piessens, V, Rasschaert G; Debruyne L; M. Heyndrickx. Quantification of *Campylobacter* spp. in chicken carcass rinse by real-time PCR. *J. Appl. Microbiol.*, 105:1909-1918, 2008.
- Cheng Z; Griffiths MW. Rapid detection of *Campylobacter jejuni* in chicken rinse water by melting-peak analysis of amplicons in real-time polymerase chain reaction. *J. Food Prot.*, 66:1343-52, 2003.
- Cloak OM; Duffy G; Sheridan JJ; Blair IS; McDowell DA. A survey on the incidence of *Campylobacter* spp. And the development of a surface adhesion polymerase chain reaction assay for the detection of *Campylobacter* in retail meat products. *Food Microbiol.*, 18:287-298, 2001.
- Cox NA; Richardson LJ; Buhr RJ; Northcutt JK; Bailey JAS; Cray PF; Hiatt KL. Recovery of *Campylobacter* and *Salmonella* serovars from the spleen, liver and gallbladder, and ceca of six- and eight-week-old commercial broilers. *J. Appl. Poult. Res.* 16, 477-480. 2007.
- Debretson A; Habtemariam T; Wilson S; Nganwa D; Yehualaeshet T. Real-time PCR assay for rapid detection and quantification of *Campylobacter jejuni* on chicken rinses from poultry processing plant. *Mol. Cell. Probes*, 21:177-181, 2007.
- Endtz HP; Ruijs GJ; Zwinderman AH; Van Der Reijden T; Biever M; Outon RP. Comparison of six media, including a semisolid agar, for the isolation of various *Campylobacter* species from stool specimens. *J. Clin. Microbiol.* 29:1007-1010, 1991.
- Epling LK; Carpenter JA; Blankenship LC. Prevalence of *Campylobacter* spp and *Salmonella* spp on pork carcasses and the reduction effected by spraying with lactic acid. *J. Food Prot.*, 56: 536-537, 1993.
- Espiñeira M, Atanassova M, Ieites JM, Santaclara FJ. Validation of a method for the detection of five species, serogroups, biotypes and virulence factors of *Vibrio* by multiplex PCR in fish and seafood. *Food Microbiol.*, 27:122-131, 2010.
- Fahey T; Morgan D; Gunneburg C; Adak GK; Majid F; Kaczmarek E. An outbreak of *Campylobacter jejuni* enteritis associated with failed milk pasteurisation. *J. Infect.*, 31:137-143, 1995.

- Flamm RK; Hinrichs DJ; Thomashow MF Introduction of pAM beta 1 into *Listeria monocytogenes* by conjugation and homology between native *L. monocytogenes* plasmids. *Infect. Immun.* 44:157–161, 1984.
- Friedman CR; Neimann J; Wegener HC; Tauxe RV. Epidemiology of *Campylobacter jejuni* infections in the United States and other industrialized nations. In: Nachamkin I; Blaser MJ. (Eds). *Campylobacter*, 2nd ed. Washington, DC:ASM Press, 2000. p. 121-138.
- Hänninen ML. Survival of *Campylobacter jejuni coli* in ground refrigerated and in ground frozen beef liver and in frozen broiler carcasses. *Acta Vet. Scand.*, 22:566-577, 1981.
- Heuvelink AE; van Heerwaarden C; Zwartkruis-Nahuis A; Tilburg JJHC; Hanna Bos M; Heilmann FGC; Hofhuis A; Hoekstra T; de Bôer E. Two outbreaks of *Campylobacteriosis* associated with the consumption of raw cows' milk. *Int. J. Food Microbiol.*, 134:70-74, 2009.
- Hillier LW; Miller W; Birney, E, et al., Sequence and comparative analysis of the chicken genome provide unique perspectives on vertebrate evolution *Nature*, 432:695-716, 2004.
- Hong Y; Berrang ME; Liu T; Hofacre CL; Sanchez S; Wang L; Maurer JL. Rapid detection of *Campylobacter coli*, *C. jejuni*, and *Salmonella enterica* on poultry carcasses by using PCR-Enzyme-Linked-Immunosorbent Assay. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69:3492–3499, 2003.
- Ieven M. Currently used nucleic acid amplification tests for the detection of viruses and atypicals in acute respiratory infections. *J. Clin. Virol.*, 40:259-276, 2007.
- Inglis D; Kalischuk L. Direct quantification of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter lanienae* in feces of cattle by real-time quantitative PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70:2296– 2306, 2004.
- Jones IG; Roworth M. An outbreak of *Escherichia coli* O157 and *Campylobacteriosis* associated with contamination of a drinking water supply. *Public Health*, 110: 277-282, 1996.
- Jones M; Sutcliffe EM; Curry M. Recovery of viable but non-culturable forms of *Campylobacter jejuni*, *J. General Microbiol.* 137:2477–2482, 1991.
- Jones, DM; Abbott, JD; Painter, MJ; Sutcliffe, EM. A comparison of biotypes and serotypes of *Campylobacter* sp. isolated from patients with enteritis and from animal and environmental sources. *J. Infect.* 9:51–8. 1984.
- Kramer JM; Frost JA; Bolton FJ; Wareing DRA. *Campylobacter* contamination of raw meat and poultry at retail sale: identification of multiple types and comparison with isolates from human infections. *J. Food Prot.*, 63:1654-1659, 2000.
- LaGier MJ; Joseph LA; Passaretti TV; Musser KA; Cirino, NM. A real-time multiplexed PCR assay for rapid detection and differentiation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Mol. Cell. Probes*, 18:275-282, 2004.

- Lin S, Wang X, Zheng H, Mao Z, Sun Y, Jiang B. Direct detection of *Campylobacter jejuni* in human stool samples by real-time PCR. *Can. J. Microbiol.*, 54:742-747, 2008.
- Lund M; Madsen M. Strategies for the inclusion of an internal amplification control in conventional and real time PCR detection of *Campylobacter* spp. in chicken fecal samples. *Mol. Cell. Probes*, 20: 92–99, 2006.
- Oliveira TCRM; Barbut S; Griffiths MW. A robotic DNA purification protocol and real-time PCR for the detection of *Campylobacter jejuni* in foods. *J. Food Prot.*, 68: 2131-2135, 2005a.
- Oliveira TCRM; Barbut S; Griffiths MW. Detection of *Campylobacter jejuni* in naturally contaminated chicken skin by melting peak analysis of amplicons in real-time PCR. *Int. J. Food. Microbiol.*, 104: 105-111, 2005b.
- On SLW. Taxonomy of *Campylobacter*, *Arcobacter*, *Helicobacter* and related bacteria: current status, future prospects and immediate concerns. Symposium Series (Society for Applied Microbiology) 90:1S–15S, 2001.
- Parkhill J; Wren BW; Mungall K; Ketley JM; Churcher C; Basham D; Chillingworth T; Davies RM; Feltwell T; Holroyd S; Jagels K; Karlyshev AV; Moule S; Pallen MJ; Penn CW; Quail MA; Rajandream MA; Rutherford KM; van Vliet AH; Whitehead S; Barrell BG. The genome sequence of the food-borne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals hypervariable sequences. *Nature*, 403:665-668, 2000.
- Rivoal K; Ragimbeau C; Salvat G, Colin P; Ermel G. Genomic diversity of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* isolates recovered from free-range broiler farms and comparison with isolates of various origins. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71(10): 6216-6227, 2005.
- Rollins DM; Colwell RR. Viable but nonculturable stage of *Campylobacter jejuni* and its role in survival in the natural aquatic environment. *Appl. Environ. Microbiol.*, 52:531–538. 1986.
- Rönner AC; Lindmark H. Quantitative detection of *Campylobacter jejuni* on fresh chicken carcasses by real-time PCR. *J. Food Prot.*; 70:1373-78, 2007.
- Rudi K; Høidal HK; Katla T; Johanen BK; Nordal J; Jakobsen K.. Direct real-time PCR quantification of *Campylobacter jejuni* in chicken fecal and cecal samples by integrated cell concentration and DNA purification. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70:790–797, 2004.
- Sails AD; Fox AJ; Bolton FJ; Wareing DRA; Greenway DLA. A real-time PCR assay for the detection of *Campylobacter jejuni* in foods after enrichment culture. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69:1383–1390, 2003.
- Skirrow MB. Epidemiology of *Campylobacter* enteritis. *Int. J. Food Microbiol.* 12:9-16, 1991.
- Stern NJ. Reservoirs for *Campylobacter jejuni* and approaches for intervention in poultry. In: Nachamkin I; Blaser MJ; Tompkins LS (Eds). *Campylobacter jejuni*: current status and future trends, Washington, DC:ASM Press, 1992. p. 49-60.

- Tauxe RV. Emerging foodborne diseases: an evolving public health challenge. *Emerg. Infect. Dis.* 3:425–434, 1997.
- Tholozan JL; Cappelier JM; Tissier JP; Delattre G; Federighi M. Physiological characterization of viable-but-nonculturable *Campylobacter jejuni* cells. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65:1110–1116, 1999.
- Wang L; Li Y; Mustapha A. Rapid and simultaneous quantitation of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* in ground beef by multiplex real-time PCR and immunomagnetic separation. *J. Food Prot.*; 70: 1366-1372, 2007.
- Wicker C; Giordano M; Rougier S; Sorin ML; Arbault P. *Campylobacter* detection in food using an Elisa based method. *J. Med. Microbiol.*, 291: 31, 2001.
- Wisessombat S; Kittiniyom K; Srimanote P; Wonglumsom W; Voravuthikunchai SP. A novel method and simple apparatus for the detection of thermophilic *Campylobacter* spp. in chicken meat products. *J. Microbiol. Methods* 76:169–173, 2009.
- Wittwer CT; Herrmann MG; Gundry CN; Elenitoba-Johnson KSJ. Real-Time Multiplex PCR Assays. *Methods*, 25:430-442, 2001.
- Workman SN; Mathison GE; Lavoie MC. Pet dogs and chicken meat as reservoirs of *Campylobacter* spp. in Barbados. *J. Clin. Microbiol.* 43:2642–50, 2005.
- Yang C; Jiang Y; Huang K; Zhu C; Yin Y; Gong JH; Yu H. A Real-time PCR Assay for the detection and quantitation of *Campylobacter jejuni* using SYBR Green I and the LightCycler. *Yale J. Biol. Med.*, 77:125-132, 2004.
- Yang-Chih Shih D. Isolation and identification of enteropathogenic *Campylobacter* spp. from chicken samples in Taipei. *J. Food Protect.*, 63:304– 308, 2000.

4 CONCLUSÕES

- O ensaio PCR multiplex padronizado apresenta sensibilidade e especificidade para detectar o gênero *Campylobacter* e diferenciar simultaneamente, *C. jejuni* e *C. coli* em culturas puras.
- A PCR multiplex possibilita a detecção rápida e específica do gênero *Campylobacter* e, simultaneamente, *C. jejuni* e *C. coli* em amostras de carne de frango artificialmente e naturalmente contaminadas, após 48h de enriquecimento seletivo.
- O ensaio qPCR em tempo real permitiu a quantificação de *C. jejuni* em culturas puras.
- A PCR em tempo real mostrou ser um método rápido, sensível e específico para a detecção de *C. jejuni* em amostras de carne de frango artificialmente e naturalmente contaminadas.
- A PCR multiplex e PCR em tempo real padronizadas demonstram serem métodos mais rápidos, sensíveis e específicos na detecção de *Campylobacter* em carcaças de frango após 48 h de enriquecimento seletivo, quando comparado aos métodos convencionais, que exige 5dias para um resultado negativo e 6-7 dias para confirmar um resultado positivo.