

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
COMISSÃO DE ESTÁGIO**

**DESENVOLVIMENTO DE ENSAIO DE MULTIPLEX-PCR
PARA IDENTIFICAÇÃO DE
Campylobacter jejuni E *Campylobacter coli***

Caroline Carniel Hiller

Porto Alegre

2010

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
DISCIPLINA DE ESTÁGIO CURRICULAR**

**DESENVOLVIMENTO DE ENSAIO DE MULTIPLEX-PCR
PARA IDENTIFICAÇÃO DE
Campylobacter jejuni E *Campylobacter coli***

Autora: Caroline Carniel Hiller

Cartão UFRGS: 144256

Orientador: Vladimir Pinheiro do Nascimento

Co-orientador: Anderlise Borsoi

**Trabalho de conclusão de curso
apresentado à Faculdade de Veterinária
como requisito parcial para obtenção
da graduação em Medicina Veterinária**

Porto Alegre

2010

AGRADECIMENTOS

À minha família, em especial aos meus pais Henrique e Nelsi pelo amor incondicional e pelo apoio oferecido na faculdade e em especial durante os seis meses de estágio.

Ao meu irmão Wagner pelo carinho e compreensão.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, em especial a Faculdade de Veterinária pela excelente instrução oferecida.

Ao Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária (CDPA) pelo ensino ofertado durante os cinco anos de estágio extra-curricular, em particular aos Professores Carlos Tadeu Pippi Salle, Hamilton Luiz de Souza Moraes e Vladimir Pinheiro do Nascimento e o biólogo Silvio Luis da Silveira Rocha, pela experiência e conhecimento passados ao longo desse período.

Aos amigos do CDPA, em especial a Juliana e Thiago, pela ajuda e auxílio na parte experimental do trabalho.

À Professora Anderlise Borsoi e ao Professor Vladimir pela orientação, não só na monografia, como também durante todo o período de graduação do curso.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
2.1 O agente	12
2.2 <i>Campylobacter</i> em saúde pública	14
2.3 <i>Multiplex</i> - PCR	15
3. MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1 Amostras	18
3.2 Isolamento bacteriológico	18
3.3 <i>Multiplex</i> – PCR.....	19
3.3.1 <i>Ensaio A</i>	20
3.3.2 <i>Ensaio B</i>	21
3.3.3 <i>Amplificação</i>	21
3.3.4 <i>Teste de sensibilidade</i>	22
3.3.5 <i>Teste de especificidade</i>	22
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28

LISTA DE TABELAS

TABELA 01 - Amostras de *C. jejuni* e *C. coli* utilizadas para a padronização do protocolo..19

TABELA 02 - Sequência dos *primers* utilizados no *multiplex*-PCR com o respectivo tamanho dos seus produtos e a espécie alvo de *Campylobacter*.....19

TABELA 03 - Reagentes e volumes utilizados na reação de *multiplex*-PCR descrita de Giessen al (1998) e de Vandamme et al (1997).....20

TABELA 04 - Diferenças nas concentrações de MgCl₂ em mM e de *Taq* em unidades dos reagentes entre o protocolo de Giessen et al (1998) e de Vandamme et al (1997) e os testados no laboratório. O Teste 1 compreende a variação na concentração de *Taq* polimerase e o Teste 2 compreende a variação na concentração de MgCl₂.....20

TABELA 05 - Diferenças nas concentrações de *Taq* polimerase em unidades e de MgCl₂ em mM testadas.....21

TABELA 06 – Amostras bacterianas utilizadas para o teste de especificidade da *m*-PCR com suas respectivas origens.....23

TABELA 07 – Protocolo com os reagentes e concentrações de *m*-PCR para detecção de *C. coli* e *C. jejuni* padronizado no laboratório.....27

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 01** – Fotomicrografia da coloração de Gram de *C. jejuni* mostrando as formas espiraladas.....13
- FIGURA 02** – Fotomicrografia de *C. jejuni* em processo de divisão celular.....13
- FIGURA 03** – Placa de mCCDA com colônias compatíveis com *C.jejuni*.....18
- FIGURA 04** – Foto do gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio do Ensaio A.....23
- FIGURA 05** – Foto do gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio do Ensaio B.....24
- FIGURA 06** – Foto do gel de agarose 2% corado com brometo de etídio dos produtos do teste de sensibilidade da PCR.....26
- FIGURA 07** – Foto do gel de agarose 2% corado com brometo de etídio dos produtos do teste de especificidade da PCR.....26

LISTA DE SIGLAS

%: Porcentagem

m: Metro (s)

cm: Centímetro (s)

m²: Metro (s) quadrado (s)

m³: Metro (s) cúbico (s)

°C: Grau (s) Celsius

h: Hora (s)

kg: Quilograma (s)

g: Grama (s)

L: Litro (s)

mL: Mililitro (s)

ppm: partes por milhão

MAPA: Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento

PCR: Reação em Cadeia pela Polimerase

VNC: Células viáveis mas não cultiváveis

OMS: Organização Mundial da Saúde

LABACVET: Laboratório de Bacteriologia Veterinária da UFRGS

ULBRA: Universidade Luterana do Brasil

RESUMO

O gênero *Campylobacter* spp. é reconhecido mundialmente como uma das principais causas bacterianas de gastroenterites em humanos. *Campylobacter* termofílicos, principalmente o *C. jejuni* e com menos expressão o *C. coli*, são geralmente isolados desses surtos. As espécies de *Campylobacter* comumente são comensais do trato intestinal de aves, e produtos de origem animal são frequentemente associados em relatos de casos em infecções em humanos. Devido ao crescimento de *Campylobacter* ser fastidioso e suas características bioquímicas serem relativamente inertes, a diferenciação entre as espécies desse organismo através da bacteriologia convencional além de consumir tempo é muito complicada. Devido a isso, a detecção por métodos que usem como base o DNA se tornou uma alternativa para a detecção de *Campylobacter*. Por essa razão, a utilização da reação em cadeia pela polimerase (PCR) para identificação de *C. jejuni* e *C. coli* promove uma identificação mais confiável. Esse trabalho teve por objetivo padronizar o protocolo de *multiplex*-PCR para detecção de *C. jejuni* e *C. coli*. Amostras ATCC foram utilizadas para a padronização do protocolo. Com a utilização de concentrações de 2mM para MgCl₂ e 1U para a *Taq* polimerase obteve-se os melhores resultados.

Palavras-chaves: *Campylobacter*, aves, PCR

ABSTRACT

Campylobacter is now recognized worldwide as a leading cause of bacterial gastroenteritis in humans. Thermophilic *Campylobacter* spp., mainly *C. jejuni* and to a lesser extent *C. coli* are recognized as the most common bacteriological causes of gastroenteritis in humans. *Campylobacter* species are common commensals in the intestinal tracts of poultry, and food products of animal origin are frequently associated with reported cases of illness. Because of campylobacters have fastidious growth requirements and relatively inert biochemical characteristics, identification of these organisms and differentiation between species within the genus *Campylobacter* by cultural methods are time consuming and difficult. As pointed, nucleic acid-based detection methods became alternatives to *Campylobacter* detection. So certain polymerase chain reaction (PCR) based species identification methods, for both *C. jejuni* and *C. coli* provide more reliable identification. This study purposed to standardize a *multiplex*-PCR protocol for *C. jejuni* and *C. coli* detection. ATCC strains were used to standardize the protocol. With concentrations like 2 mM of MgCl₂ and 1U of *Taq* polymerase the best results was obtained.

Keywords: *Campylobacter*, poultry, PCR.

1. INTRODUÇÃO

No ano de 2009 a produção brasileira de carne de frango atingiu a marca histórica de 10,9 milhões de toneladas, garantindo ao Brasil uma posição entre os três maiores produtores mundiais de carne de frango, com Estados Unidos e China. Desse total, 65% permanecem no mercado interno, o que comprova a força dessa indústria para o país.

Nas exportações, o Brasil mantém, desde 2004, a posição de maior exportador mundial, tendo terminado 2009 com a marca de 3,6 milhões de toneladas embarcadas para mais de 150 países. Quando comparamos esse número ao de 2008 notamos uma queda de 0,3% em relação aos embarques de 3,64 milhões de toneladas efetuadas entre janeiro e dezembro de 2008. O setor exportador de carne de frango brasileiro foi impactado principalmente pela retração da economia mundial – devido à crise financeira internacional – com a redução de preços e de encomendas de clientes importantes como Rússia, Japão e Venezuela, e pela valorização do real frente ao dólar americano. No Brasil, o estado do Rio Grande do Sul ocupa a terceira posição entre os estados exportadores de carne de frango, apresentando 21% das exportações do país.

A *Campylobacter* spp. é reconhecida mundialmente como uma das principais causas de infecção bacteriana cursando com gastroenterite em humanos. A ocorrência de surtos alimentares causados por bactérias do gênero *Campylobacter* tem sido relacionada ao consumo de produtos de origem animal, principalmente os produtos de procedência avícola.

A *Campylobacter* por ser considerada como um organismo comensal do trato digestório das aves durante o processo de abate, pode haver contaminação de suas carcaças, devido a procedimentos incorretos realizados nos abatedouros, como a evisceração. As superfícies de manipulação localizadas nos abatedouros, devido ao manuseio inadequado das carcaças contaminadas, também pode ser considerada como fonte. As espécies termotolerantes, como a *C. coli* e *C. jejuni* são frequentemente isoladas de surtos de gastroenterites em humanos.

O gênero apresenta como característica morfológica a forma de pequenos bastonetes Gram negativos curvos ou espiralados, em forma de “S” sendo altamente móveis - movimentos do tipo saca-rolha ou vai e vem. Não crescem aerobicamente, mas também não crescem em condições estritamente anaeróbicas ou em meios reduzidos.

O isolamento de *Campylobacter* no laboratório é considerado fastidioso, e a identificação através da bacteriologia convencional das suas diferentes espécies é difícil, pois

não existem grandes diferenças bioquímicas entre elas. A reação em cadeia pela polimerase (PCR) é considerada uma ferramenta que possui elevada sensibilidade e especificidade, podendo ser utilizada na detecção das espécies de *Campylobacter* e o *multiplex*-PCR é capaz de amplificar dois ou mais *locus* na mesma reação.

Esse trabalho teve por objetivo o desenvolvimento de um protocolo de *multiplex*-PCR para identificação de *C. coli* e *C. jejuni* para ser utilizado na rotina laboratorial do Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária (CDPA-UFRGS).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O gênero *Campylobacter* spp. tem sido foco crescente de atenção nos últimos anos devido ao aumento da frequência com que essas bactérias foram isoladas de homens, animais, alimentos e água (BUTZLER, 2004). As aves domésticas albergam *Campylobacter* spp. no intestino que, através da manipulação e operações de abate mal conduzidas e sem a observação de práticas higiênicas, contaminam a carcaça de outras aves. A carne e os miúdos de frango são fontes potenciais de *Campylobacter* spp. para o homem (CARVALHO et al., 2002).

2.1 O agente

O gênero *Campylobacter* foi criado em 1963 e sua estrutura taxonômica mudou bastante desde a sua descoberta (ON, 2001). A família Campylobacteriaceae compreende 18 espécies, seis subespécies e dois biovars.

Suas características morfológicas incluem pequenos bastonetes Gram negativos curvos ou espiralados (Figura 01), em forma de “S” ou asa de gaivota (Figura 02); apresentam de 0,2 µm a 0,9 µm de largura e 0,2 µm a 5 µm de comprimento (BUTZLER, 2004; KEENER et al. 2004; HUMPHREY, 2007).

Altamente móveis - movimentos do tipo saca-rolha ou vai e vem - sua motilidade pode ser vista com o auxílio de um microscópio de contraste de fase ou campo escuro, apresentam flagelos em um ou nos dois pólos, sendo anfitriquios ou monotríquios. Necessitam de 5 a 7% de O₂, 10% de CO₂ e 85% de N₂ para crescimento. Não fermentam açúcares, são catalase e oxidase positiva e não produzem indol. Não crescem aerobicamente, mas também não crescem em condições estritamente anaeróbicas ou em meios reduzidos. Em ágar sangue, as colônias são pequenas, medindo 1 a 3 mm de diâmetro, espirais, lisas, translúcidas, não hemolíticas (HUMPHREY, 2007; KUANA, 2008).

As espécies *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, e *C. upsaliensis* são conhecidas como campilobacters termotolerantes ou termofílicos (BOLTON, 2001), pois possuem uma faixa de temperatura de crescimento estreita, com temperatura máxima de aproximadamente 46°C e mínima de 30°C (HUMPHREY, 2007), tendo o crescimento otimizado a 42°C e incapaz de crescer em temperaturas inferiores a 30°C (KEENER et al. 2004).

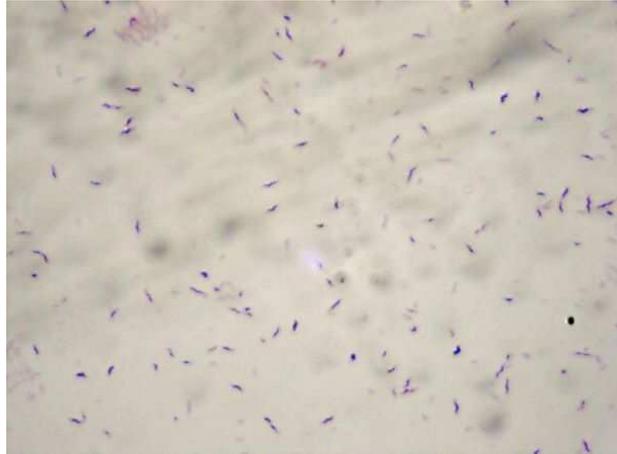


FIGURA 1 – Fotomicrografia da coloração de Gram de *C. jejuni* mostrando as formas espiraladas. Aumento de 100X.
Fonte: Autora

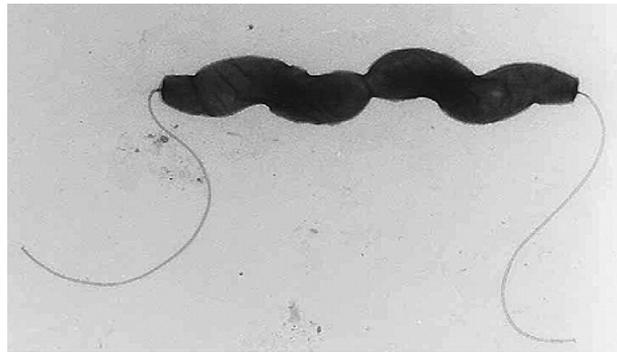


FIGURA 02 – Fotomicrografia de *C. jejuni* em processo de divisão celular.
Fonte: HUMPHREY, 2007.

Evidências experimentais sugerem que no ambiente, sob certas condições, *C. jejuni* gera formas viáveis, mas não cultiváveis (VNC) especialmente na presença de biofilmes derivados de aviários (TRACHOO et al., 2002). Rollins e Colwell (1986) demonstraram que VNC pode ocorrer também em água. Segundo Rowe et al. (1998), VNC da *Campylobacter* spp é induzida pelo estresse causado por escassez de nutrientes no meio, dentre outros fatores, e representa uma estratégia de sobrevivência do organismo no ambiente natural. Esse fator é uma grande desvantagem no isolamento e estoque das amostras de *Campylobacter*, pois após 72h do primeiro isolamento esse microorganismo já pode se tornar VNC (JONES et al., 1991). Quando o organismo entra nessa fase de “dormência” ele se transforma em uma forma cocóide (NAIR et al., 1984), tornando seu re-isolamento e sua preservação difícil em laboratório (SAHA & SANYAL, 1991).

Campylobacter spp é inativada em temperatura de congelamento de -15°C em 3 dias (STERN & KOTULA, 1982), contudo, o congelamento não elimina o patógeno de alimentos

contaminados (LEE et al., 1998). Hazeleger et al. (1994) afirmam que células de *Campylobacter* spp sobrevivem por um longo período a 4°C, mas não são viáveis em pH abaixo de 4,9. O microrganismo é capaz de crescer em pH de 4,9 a 9,0, sendo ótimos valores entre 6,5 a 7,5.

Embora as espécies de *Campylobacter* termofílicas não sejam considerados patógenos importantes nas aves, ele apresentam importância na segurança alimentar e em saúde pública, sendo o *C. jejuni* responsável pela maioria dos casos de campilobacteriose em humanos, seguido pelo *C.coli* e, raramente, pelo *C. lari*.

2.2 *Campylobacter* em saúde pública

O primeiro caso relatado em humanos foi descrito por Vinzent et al (1947) que isolaram bactérias com formas espiraladas, classificando como *Vibrio fetus* do sangue de três mulheres grávidas que foram internadas no hospital devido a febre de causa indeterminada. A internação durou quatro semanas e duas das mulheres sofreram aborto. Foi em Illinois em maio de 1938 que envolveu um surto de diarreia em um presídio, afetando 355 presos de duas instituições de dois adjacentes estados. A cultura fecal das 73 vítimas foi negativa, mas microscopicamente foi positiva em 31 casos, e os organismos encontrados eram semelhantes a '*Vibrio jejuni*' com crescimento em caldos de cultura do sangue de 13 vítimas (LEVY, 1946). Em 1963, o organismo foi reclassificado como *Campylobacter* por Sebald e Verón.

A campylobacteriose em humanos é um problema significativo e tem aumentado nos últimos anos não só na União Européia, como no contexto global (ANON, 2009). Segundo Allos (2001), infecções por *Campylobacter* spp. é a causa mais comum de gastroenterites no mundo, causando uma estimativa de 2.5 milhões de casos a cada ano nos Estados Unidos da América, representando um impacto econômico elevado quando somamos a perda de horas de trabalho com cuidados na área de saúde humana.

Campylobacter pode ser isolado de diversas amostras ambientais e do intestino de várias espécies (FROST, 2001). Das espécies de *Campylobacter*, as mais envolvidas em surtos em humanos são a *C.coli* e a *C. jejuni* (DICKINS et al.,2002) podendo chegar a 95% das infecções (BUTZLER, 2004).

A Organização Mundial de saúde (OMS) estima que aproximadamente 1% da população do oeste Europeu se infecta com espécies de *Campylobacter* a cada ano. Essa

estimativa é confirmada por dados da Inglaterra (WHEELER et al., 1999) que encontraram para cada caso notificado de infecção por *Campylobacter*, nove outros casos não notificados.

A dose infectante de *Campylobacter* é baixa, aproximadamente 100 células (ANONYMOUS, 2005). A infecção tem um período de incubação de 1 a 10 dias, e a maioria das pessoas exibe sintomas clínicos por 4 dias. Os sintomas incluem: diarreia sanguinolenta, particularmente em crianças, dor abdominal aguda e febre. A maioria dos casos requer apenas tratamento de suporte e descanso (HUMPHREY, 2007). O *C. jejuni* é isolado com maior frequência de casos em humanos, cerca de 10-20 vezes mais que o *C. coli* (ENGLER, 2002).

A síndrome de Guillain-Barré (SGB) é uma condição paralisante, é reconhecida como a complicação mais agravante da infecção por *Campylobacter*, com uma incidência de 1 de cada 1000 casos de infecção (GILBERT, 2004). *C. jejuni* é o agente mais observado em infecções que antecedem os casos de SGB. No geral, um em cada três pacientes com SGB apresentaram infecção antecedente com *C. jejuni*. Os sintomas da SGB geralmente ocorrem 1-3 semanas após a enterite por *Campylobacter*. Os casos de SGB associados com *Campylobacter* geralmente são mais severos e requerem tratamento hospitalar intensivo (HUMPHREY, 2007).

Produtos derivados de aves contaminados com espécies de *Campylobacter* termofílicos são considerados uma das principais fontes de infecção para humanos, e essa contaminação está ligada ao status de infecção dos lotes durante o abate (ROSENQUIST et al. 2006). Nas aves, a *Campylobacter* é considerada um organismo comensal. Quando aves colonizadas por *Campylobacter* entram nas plantas industriais, suas carcaças podem sofrer contaminações durante o processo de abate (JACOBS-REITSMA, 2000).

2.3 Multiplex - PCR

A reação em cadeia pela polimerase (PCR) é uma técnica *in vitro* de amplificação do DNA, onde ocorre uma replicação exponencial do DNA alvo na presença de oligonucleotídeos sintéticos (dNTP), *primers* e enzimas estáveis a elevadas temperaturas. Através dessa técnica, uma seqüência particular de interesse pode ser amplificada, tornando-se majoritária na amostra pesquisada. Deste modo, dois pequenos fragmentos de DNA, normalmente de 20 pares de bases (*primers*), são sintetizados *in vitro*. Estes *primers* são complementares aos da região do DNA alvo que se pretende amplificar. A descrição da técnica de PCR teve sua primeira publicação em 1985, por Saiki et al. e Mullis et al em 1986/87 detalharam a metodologia da técnica, o que rendeu a Mullis o prêmio Nobel em 1993.

O princípio da técnica de PCR é simples e baseia-se em ciclos de síntese de DNA, onde cada ciclo é constituído por três passos:

1. Desnaturação da dupla fita de DNA a ser amplificado;
2. Anelamento dos *primers* com sua seqüência alvo;
3. Extensão dos *primers* com a utilização dos dNTP da reação;

Apesar de sua simplicidade, a PCR pode ser afetada por uma variedade de parâmetros, entre eles, o desenho dos *primers*, a existência de áreas de homologia na seqüência do DNA molde, a temperatura de anelamento, a concentração de nucleotídeos utilizada, e principalmente pela presença de inibidores (proteínas) (Erlich, 1989).

O *multiplex-PCR* (*m-PCR*) foi descrito pela primeira vez em 1988 por Chamberlain et al, e consiste em uma variante das PCR a qual amplifica simultaneamente dois ou mais *locus* em uma única reação, usando mais de um par de *primers*. Esse mesmo autor cita que uma das grandes vantagens da técnica é a diminuição com custos de reagentes, tempo para preparação do ensaio, que é menor quando comparado a técnica convencional.

Alguns pontos importantes na técnica de PCR devem ser acompanhados. *Primers* inapropriados, tempo ou temperaturas inconformes, qualidade duvidosa da *Thermus aquaticus* (*Taq*) ou uma incorreta concentração de cloreto de magnésio ($MgCl_2$) podem afetar diretamente a reação de PCR. Esses fatores devem ser otimizados com a realização de vários testes de temperaturas, diluições seriadas na concentração de $MgCl_2$ e a utilização de seqüência de *primers* complementares a região alvo estudada (MEZEI, 1998).

A concentração final de $MgCl_2$ funcional para maioria das reações varia entre 1,5 mM e 2,0 mM. Concentrações abaixo de 1,5 mM são em geral pouco funcionais, concentrações acima de 2,0 mM podem gerar resultados satisfatórios, mas normalmente existe um incremento na amplificação de bandas inespecíficas. A concentração de $MgCl_2$ é um cofator indispensável para o funcionamento da enzima *Taq* polimerase, afetando o sucesso e a especificidade da amplificação (SATSANGI, 1994). Outro fator importante é a concentração de *Taq* polimerase, a falta pode amplificar fracamente o DNA alvo, gerando bandas de difícil visualização. Por outro lado o excesso facilita a amplificação de produtos inespecíficos que acabam utilizando grandes quantidades de *primers* e enzimas dificultando assim a amplificação da região específica.

A especificidade da PCR se dá através da escolha da região que será amplificada. O segmento de DNA alvo da PCR deve ser característico do respectivo organismo ou grupo de espécies selecionadas, e o conhecimento da seqüência de nucleotídeos é indispensável para o sucesso da reação (HE et al, 1994). Um *design* correto dos *primers* promove elevada

especificidade e eficiência da reação. O tamanho ideal do *primer* deve variar entre 18-24 nucleotídeos.

Um problema que pode ser encontrado freqüentemente em uma reação de PCR, especialmente quando há o envolvimento de genomas complexos, é o aparecimento de bandas inespecíficas entre seus produtos. Ajustes na concentração de $MgCl_2$ e na temperatura de anelamento podem resolver esse problema. O *touchdown*-PCR é uma ferramenta que consiste em pré-ciclos de amplificações, onde há a variação na temperatura de anelamento e que reduz o número de bandas inespecíficas da reação (DON et al, 1991). A variação na temperatura de anelamento se inicia através de temperaturas mais elevadas do que a temperatura de anelamento do ciclo final.

A PCR pode ser utilizada na rápida identificação de culturas puras de diversos patógenos envolvidos em surtos alimentares, como *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 e *Campylobacter* spp. Também é aplicada na detecção direta de patógenos de alimentos ou amostras clínicas com ou sem pré-enriquecimento. Essa técnica possui alta sensibilidade para determinadas espécies, e pode detectar organismos alvo na presença de outros organismos (VAN DOORN, 1998).

Enquanto meios seletivos para o isolamento de *Campylobacter* spp. são úteis para a identificação inicial, métodos bioquímicos de identificação são geralmente trabalhosos e podem ocasionar resultados ambíguos (ENGLLEN, 2002). Recentemente, a PCR tem sido utilizada como ferramenta na detecção e identificação de *Campylobacter* spp. Com essa técnica houve a melhoria da sensibilidade e acurácia na detecção, e está aliada ao rápido processamento quando comparada a outros métodos de detecção (OLSEN et al. 1995; ON, 1996). Com o desenvolvimento de novas metodologias da PCR, como a utilização de vários *primers* (*multiplex*) no mesmo *set*, há a identificação de mais de uma espécie em um único ensaio (EDWARDS e GIBBS, 1994).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostras

Para padronização do protocolo de *mutiplex* - PCR para *C. jejuni* e *C. coli* foram utilizadas duas amostras ATCC (*American Type Cell Culture*) como controles positivos.

A pesquisa foi realizada no Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária (CDPA), da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) localizado em Porto Alegre, RS.

3.2 Isolamento bacteriológico

Amostras ATCC foram processadas a fim de obterem-se colônias puras da cultura, para isso utilizou-se equipamento estéril apropriado, citado adiante. As amostras foram reativadas em 9 mL de caldo Bolton (Oxoid), os tubos foram homogeneizados e colocados em jarras bacteriológicas com geradores de microerofilia (Microaerobac - PROBAC do Brasil) e incubados em estufa bacteriológica a uma temperatura de 37°C durante 48 horas. Após este período, com auxílio de alça bacteriológica, cada cultura bacteriana do caldo Bolton foi semeada em placas contendo o ágar mCCDA (*Modified Charcoal Cefoperazone Deoxycholate Agar*, Oxoid), também foram colocadas em jarras bacteriológicas com geradores de microerofilia e incubadas a uma temperatura de 37°C por um período 48 horas. A figura 03 mostra uma placa de mCCDA com colônias compatíveis com *C. jejuni*.

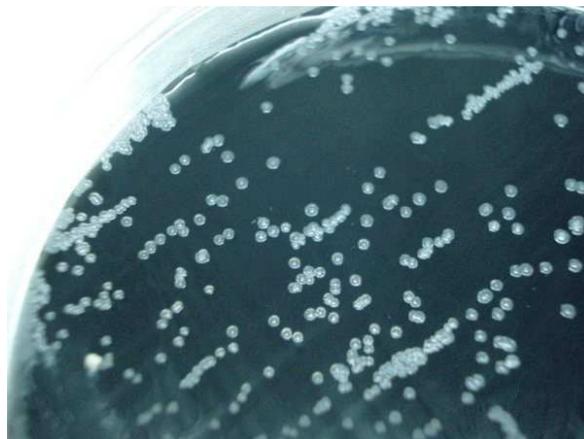


FIGURA 03 – Placa de mCCDA com colônias compatíveis com *C.jejuni*.

Para a realização do ensaio da PCR foram colhidas colônias do ágar mCCDA compatíveis com *Campylobacter* spp. e ressuspendidas em 1 mL de água ultra-pura,

transferidas para microtubos do tipo ependorfes, congeladas e estocadas no freezer a -20°C. Essas amostras foram utilizadas para realização da *multiplex*-PCR.

O caldo Bolton e o ágar mCCDA são considerados meios de cultura seletivos para o crescimento de *Campylobacter* spp. Os meios de cultura utilizados no trabalho foram suplementados com antimicrobianos seletivos próprios para os mesmos e sua preparação seguiu as instruções dos fabricantes.

As amostras utilizadas como controles negativos da reação de PCR foram isoladas conforme o protocolo *standard* microbiológico para cada cepa. O DNA foi coletado diretamente do caldo de enriquecimento utilizado.

3.3 *Multiplex* – PCR

O protocolo de *multiplex*-PCR padronizado no laboratório foi adaptado a partir dos trabalhos de Giessen et al (1998) e de Vandamme et al (1997). As amostras utilizadas para a padronização do protocolo estão especificadas na tabela 01. A sequência dos *primers* utilizados no *multiplex*-PCR são descritas na tabela 02.

TABELA 01 – Amostras de *C. jejuni* e *C. coli* utilizadas para a padronização do protocolo.

Bactéria	ATCC
<i>Campylobacter jejuni</i>	29428
<i>Campylobacter coli</i>	43478

TABELA 02 – Sequência dos *primers* utilizados no *multiplex*-PCR com o respectivo tamanho dos seus produtos e a espécie alvo de *Campylobacter*.

Primer	Tamanho (pb)	Sequência 5'-3'	Espécie
JUN 3	773	CAT CTT CCC TAG TCA AGC CT	<i>C. jejuni</i>
JUN 4		AAG ATA TGG CAC TAG CAA GAC	
COL 1	364	AGG CAA GGG AGC CTT TAA TC	<i>C. coli</i>
COL 2		TAT CCC TAT CTA CAA ATT CGC	

O DNA das amostras foi extraído pelo método de termo-extração conforme a técnica descrita por Borsoi (2008) que consiste em aquecimento e repetições de centrifugações de alíquotas do caldo da cultura bacteriana e lavagem da amostra. O sobrenadante do processo de aquecimento foi transferido para outro ependorfe e mantido a -20°C.

O protocolo de amplificação utilizado como base para o teste em laboratório, descrito por de Giessen et al (1998) e de Vandamme et al (1997) se encontra na tabela 03.

TABELA 03 – Reagentes e volumes utilizados na reação de *multiplex*-PCR descrita de Giessen al (1998) e de Vandamme et al (1997).

Reagentes	Volume (µL)
Água ultra-pura	15.5
Tampão 10X	2.5
dNTP mix (2 mM)	1.0
MgCl ₂ (25 mM)	2.5
<i>Primer</i> Col1 (100 pmol)	0.5
<i>Primer</i> Col2 (100 pmol)	0.5
<i>Primer</i> Jun3 (100 pmol)	0.5
<i>Primer</i> Jun4 (100 pmol)	0.5
Taq polimerase (0,5 U)	0.5
DNA	1
Volume final	25

Para a padronização do protocolo de *multiplex*-PCR para *C. jejuni* e *C. coli* os protocolos de Giessen et al (1998) e de Vandamme et al (1997) foram utilizados como base e outros testes foram realizados para adequação desse ao laboratório. Para um melhor entendimento das etapas desenvolvidas no trabalho, houve a separação dos testes em dois ensaios, A e B.

3.3.1 Ensaio A

No ensaio A do *m*-PCR dois testes foram realizados. O Teste 1 consistiu na variação na concentração de *Taq* polimerase em relação ao protocolo original e o Teste 2 na variação na concentração de MgCl₂ em relação ao protocolo original de Giessen et al (1998) e de Vandamme et al (1997).

Nesses testes não houve variação nos outros componentes do *mix*, bem como alterações na concentração de *primes*, dNTPs e no volume de DNA utilizado. A tabela 04 mostra as diferenças entre o protocolo original de Giessen et al (1998) e de Vandamme et al (1997) e os testes 1 e 2 realizados no laboratório.

TABELA 04 – Diferenças nas concentrações de $MgCl_2$ em mM e de *Taq* em Unidades dos reagentes entre o protocolo de Giessen et al (1998) e de Vandamme et al (1997) e os testados no laboratório. O Teste 1 compreende a variação na concentração de *Taq* polimerase e o Teste 2 compreende a variação na concentração de $MgCl_2$

Reagentes	Giessen/Vandamme	Teste 1	Teste 2
$MgCl_2$	25 mM	25mM	2,5 mM
<i>Taq</i> polimerase	0,5 U	1 U	0,5 U

3.3.2 Ensaio B

Os resultados obtidos no ensaio A (mostrados adiante) não foram satisfatórios. Logo, optou-se pela realização de um segundo ensaio (Ensaio B), ampliando a variação na concentração de *Taq* polimerase e de $MgCl_2$. Outros quatro testes foram feitos, variando a concentração de $MgCl_2$ (de 2 a 2,5 mM) e de *Taq* polimerase (de 0,5 a 1U), com a utilização da combinação dessas concentrações. A tabela 05 mostra essas variações. Nesse ensaio também não houve variações nos outros componentes do *mix*, como na concentração de *primers*, dNTPs e no volume de DNA a ser utilizado.

TABELA 05 – Diferenças nas concentrações de *Taq* polimerase em unidades e de $MgCl_2$ em mM testadas.

Reagentes	Teste 3	Teste 4	Teste 5	Teste 6
$MgCl_2$ (mM)	2	2	2,5	2,5
<i>Taq</i> polimerase (U)	1	0,5	0,5	1

3.3.3 Amplificação

As reações de amplificação dos dois ensaios foram realizadas no termociclador Perkin Elmer Gen Amp PCR System 2400 (Perkin Elmer Cetus, Norwalk, CT, USA).

As amostras foram submetidas a reação de amplificação seguindo o protocolo *touchdown* composto por: uma desnaturação inicial por 5 minutos a 94°C; dois ciclos contendo uma desnaturação inicial de 1 minuto a 94°C, temperatura de anelamento de 64°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto; seguida de dois ciclos contendo uma desnaturação de 1 minuto a 94°C, temperatura de anelamento de 62°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto; seguida de dois ciclos contendo desnaturação a 94°C por 1 minuto, temperatura de anelamento de 60°C por 1 minuto e extensão de 72°C por 1 minuto; seguida

de dois ciclos contendo uma desnaturação a 94°C por 1 minuto, temperatura de anelamento de 58°C por 1 minuto e extensão de 72°C por 1 minuto; seguida de dois ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, temperatura de anelamento de 56°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto; seguida de 30 ciclos contendo uma desnaturação a 94°C por 1 minuto, temperatura de anelamento de 54°C por 1 minuto e extensão da cadeia a 72°C por 1 minuto; seguida por uma extensão final a 72°C por 10 minutos.

A eletroforese dos produtos do PCR (*amplicons*) gerados nos dois ensaios foi realizada em gel de agarose 2% corado com adição de 20% de brometo de etídio. Os fragmentos do DNA amplificado foram visualizados em trans-iluminador UV.

3.3.4 Teste de sensibilidade

O teste de sensibilidade fornece os limites de detecção do *m*-PCR. Para realização desse teste, as amostras ATCC de *C. jejuni* e *C. coli* foram cultivadas e isoladas conforme metodologia de isolamento bacteriológico descrito anteriormente. Após o isolamento, um número de quatro colônias de *C. coli* e *C. jejuni* foram suspensas em água ultra-pura em microtubos estéreis de 1,5mL. A extração do DNA dessas culturas foi realizada pela técnica de termo-extração também descrita anteriormente.

Após a extração do DNA das amostras, foram realizadas diluições seriadas do DNA em água ultra-pura. O DNA puro extraído das colônias foi considerado como a diluição 10^0 . Foram realizadas quatro diluições do DNA das amostras. A diluição 10^{-1} foi feita a partir da passagem de 2 μ L da diluição 10^0 para outro ependorfe com 18 μ L de água ultra-pura. Já a diluição 10^{-2} foi feita passando-se 2 μ L da diluição 10^{-1} para outro ependorfe com 18 μ L de água ultra-pura. Na última diluição um volume de 2 μ L do ependorfe foi desprezado. O teste foi realizado até a diluição 10^{-4} tanto para *C. jejuni* como para *C. coli*.

A sensibilidade da PCR foi feita através de diluições seriadas do DNA alvo a ser amplificado.

Todas as diluições (10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}) do DNA de *C. coli* e *C. jejuni* foram testadas no protocolo de *m*-PCR.

3.3.5 Teste de especificidade

O teste de especificidade do *m*-PCR tem por objetivo evitar a formação de falsos positivos e tem ligação direta com uma hibridização correta dos *primers* com a região alvo do

DNA a ser amplificada. Para o teste de especificidade do *m*-PCR, uma série de amostras bacterianas foi utilizada (Tabela 06).

TABELA 06 – Amostras bacterianas utilizadas para o teste de especificidade da *m*-PCR com suas respectivas origens.

Bactéria	Origem
<i>Campylobacter coli</i>	ATCC 33559
<i>Campylobacter jejuni</i>	ATCC 33560
<i>Campylobacter fetus</i>	LABACVET
<i>Escherichia coli</i>	BACTERIOTECA CDPA
<i>Salmonella Gallinarum</i>	BACTERIOTECA CDPA
<i>Salmonella Enteritidis</i>	BACTERIOTECA CDPA
<i>Salmonella Typhimurium</i>	BACTERIOTECA CDPA
<i>Arcobacter butzleri</i>	BACTERIOTECA ULBRA
<i>Arcobacter cryaerophilus</i>	BACTERIOTECA ULBRA
<i>Mycoplasma gallinarum</i>	BACTERIOTECA CDPA
<i>Mycoplasma sinoviae</i>	BACTERIOTECA CDPA

A reação de amplificação utilizada no teste de especificidade foi a mesma descrita no item 3.3.3.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no ensaio A não foram satisfatórios. Tanto os produtos da PCR gerados pela reação de amplificação descrita no protocolo de Giessen e Vandamme como as variações na concentração de *Taq* polimerase e de $MgCl_2$ (Teste 1 e 2) realizadas apresentaram um elevado número de bandas inespecíficas.

A figura 04 mostra a foto do gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio com os produtos da PCR gerados do ensaio A.

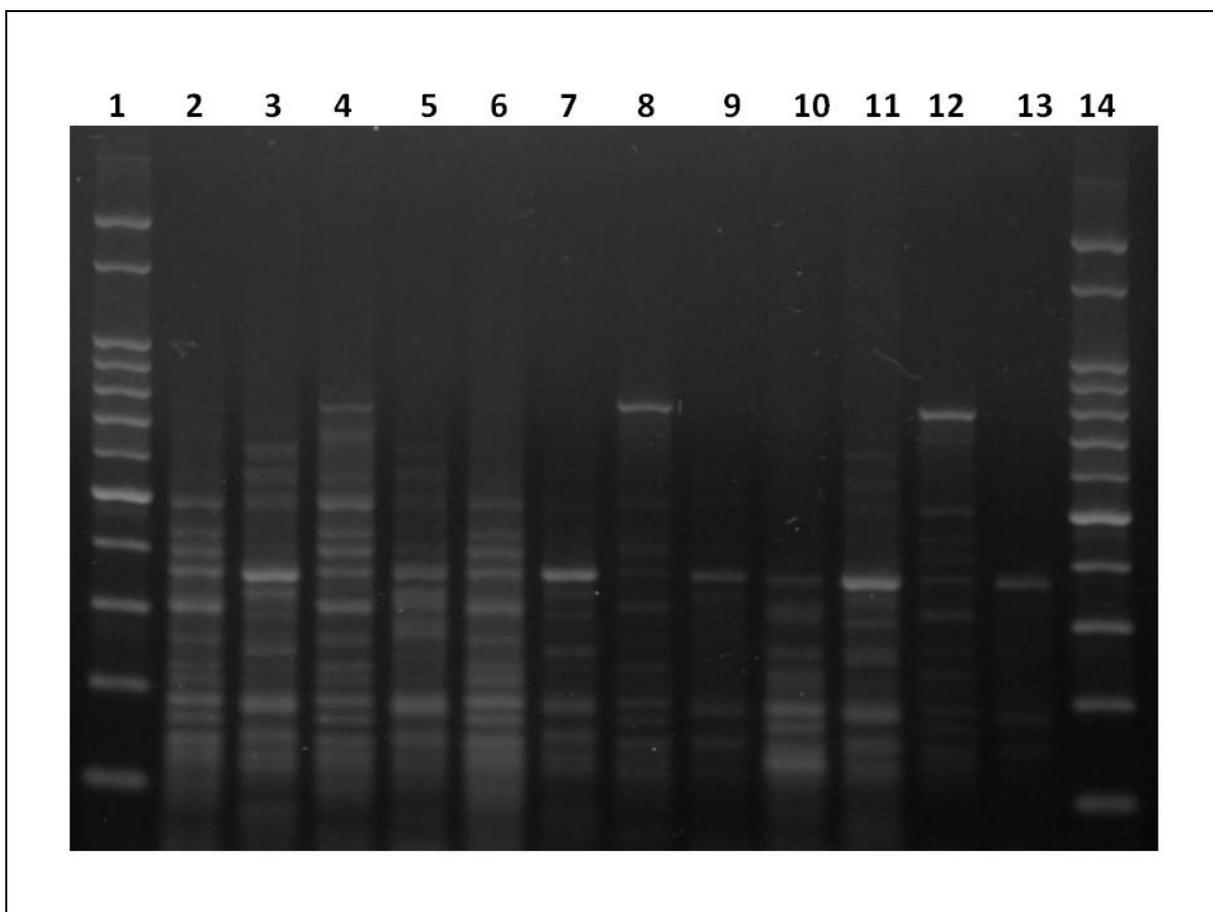


FIGURA 04 – Foto do gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio dos produtos do PCR do Ensaio A. Legenda: 1 e 14: marcador de peso molecular de 100 pb. As bandas 2 a 5 referem-se ao protocolo original, descrito por Giessen e de Vandamme, onde as colunas 2 e 4 apresenta amostras de *C. jejuni* e as 3 e 5 de *C. coli*. Colunas 6 a 9 referem-se ao Teste 1 (variação na concentração de *Taq* polimerase) onde a as colunas 6 e 8 são amostras de *C. jejuni* e as 7 e 9 de *C. coli*. Colunas 10 a 13 referem-se ao Teste 2 (variação na concentração de $MgCl_2$), onde as colunas 10 e 12 são amostras de *C. jejuni* e as 11 e 13 de *C. coli*.

O ensaio B foi realizado devido ao elevado número de bandas inespecíficas geradas no ensaio A. No ensaio B foram feitos outros testes (Testes 3, 4, 5 e 6), variando-se a

concentração de *Taq* polimerase (0,5 e 1 U) e de $MgCl_2$ (2 e 2,5mM). A figura 05 mostra a foto do gel de agarose com os resultados obtidos do Ensaio B (o teste 6 não é mostrado).

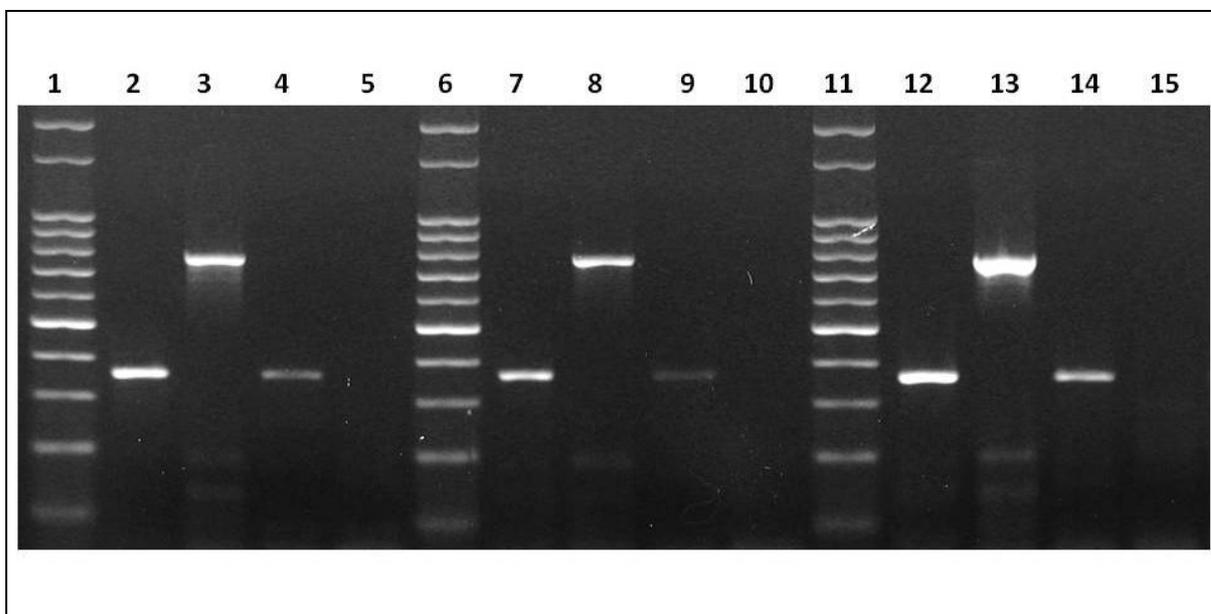


FIGURA 05 – Foto do gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio dos produtos do PCR do Ensaio B. Legenda: Colunas 1, 6 e 11: MPM de 100 pb. Colunas 5, 10 e 15: controle negativo da reação (amostra sem DNA). As colunas 2 a 5 referem-se ao Teste 3, onde 2 e 4 são amostras de *C. coli* e a coluna 3 de *C. jejuni*. Colunas 7 a 10 referem-se ao Teste 4, onde 7 e 9 são amostras de *C. coli* e a coluna 8 de *C. jejuni*. Colunas 12 a 15 referem-se ao Teste 5, onde 12 e 14 são amostras de *C. coli* e a coluna 13 de *C. jejuni*. Banda de 774 pb compatível com *C.jejuni* e 364 com *C. coli*.

Os resultados obtidos do ensaio B foram satisfatórios. A partir desse ensaio foi possível a implantação do protocolo de *m*-PCR no laboratório. O teste 03 foi utilizado como base para o protocolo de *m*-PCR do laboratório. O manual da Organização Mundial da Saúde (OMS) de 2003 cita o protocolo utilizado nesse experimento como padrão para a diferenciação de *C. jejuni* e *C. coli*.

Weijtens et al (1999) utilizando o protocolo descrito por Giessen et al (1998) detectaram a presença de *C. coli* em fezes de suínos em fase de terminação.

O teste de sensibilidade revelou um limite de detecção para 10^{-2} para *C. jejuni* e 10^{-1} para *C.coli*. Os limites de detecção do teste de sensibilidade do *m*-PCR se encontram na figura 06 e a figura 07 mostra o resultado do teste de especificidade realizado.

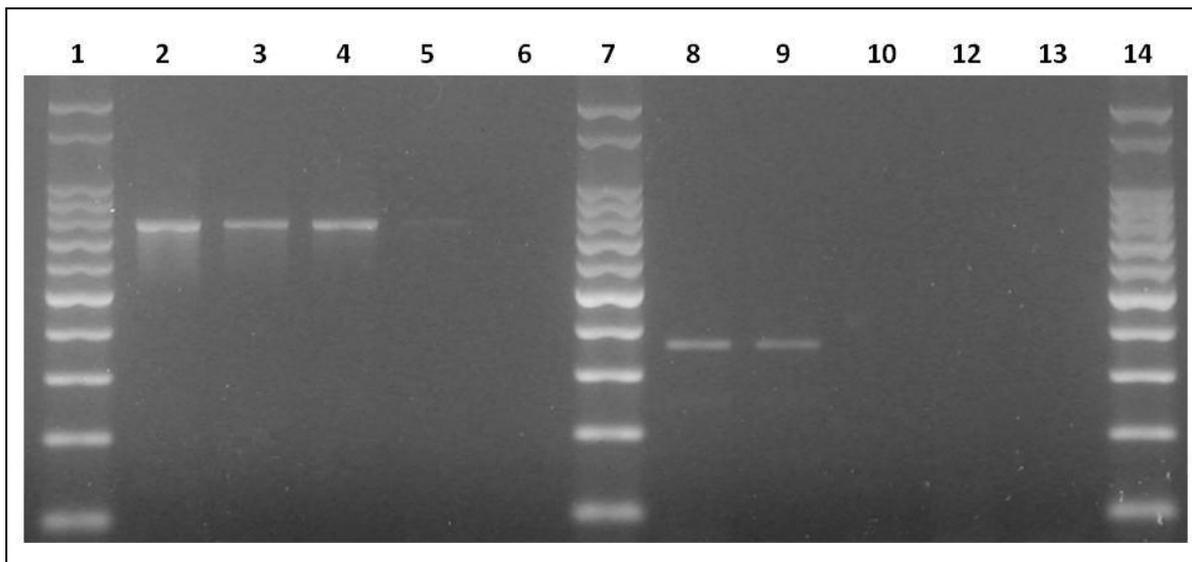


FIGURA 06 – Foto do gel de agarose 2% corado com brometo de etídio dos produtos do teste de sensibilidade da PCR.

Legenda: 1, 7 e 14: MPM de 100 pb. Coluna 13: controle negativo da reação. Colunas 2 a 6 referem-se às diluições do DNA de *C. jejuni*, onde 2 corresponde a diluição 10^0 , 3: 10^{-1} , 4: 10^{-2} , 5: 10^{-3} e 6: 10^{-4} . Colunas 8 a 12 referem-se às diluições do DNA de *C. coli*, onde 8 corresponde a diluição 10^0 , 9: 10^{-1} , 10: 10^{-2} , 11: 10^{-3} e 12: 10^{-4} . Banda de 773 pb compatível com *C.jejuni* e 364 com *C. coli*.

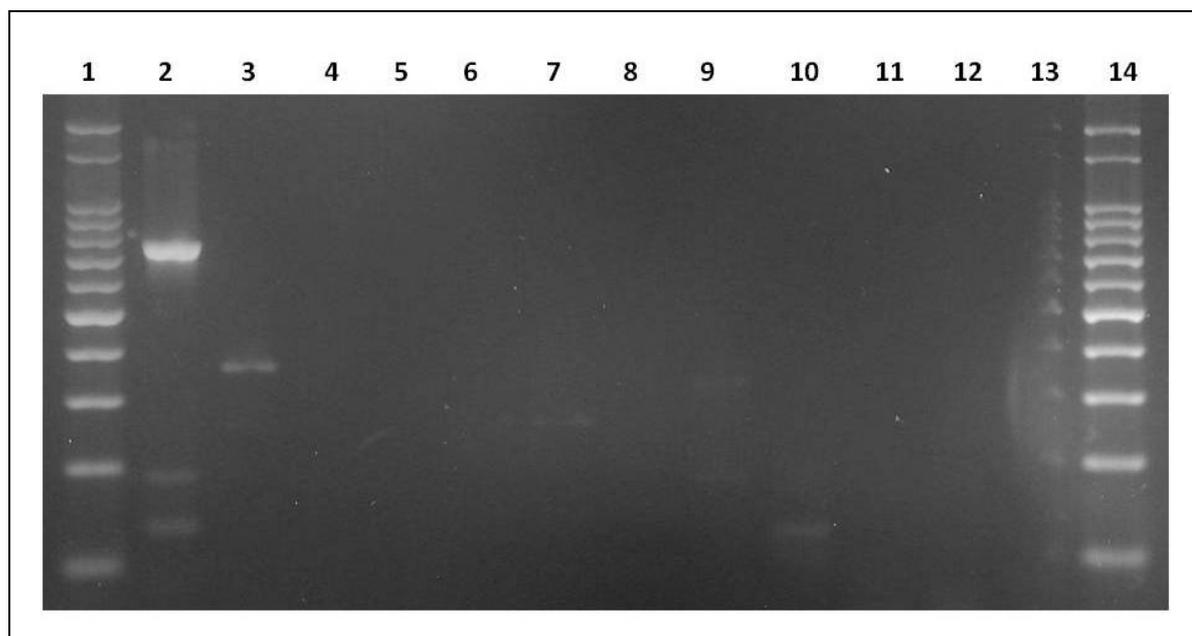


FIGURA 07 – Foto do gel de agarose 2% corado com brometo de etídio dos produtos do teste de especificidade da PCR.

Legenda: 1 e 14: MPM de 100 pb. Coluna: 2: *C. jejuni*; 3: *C. coli*; 4: *E. coli*; 5: *S. Gallinarum*; 6: *S. Typhimurium*; 7: *S. Enteritidis*; 8: *C. fetus*; 9: *A. cryaerophilus*; 10: *A. butzleri*; 11: *M. gallinarum*; 12: *M. sinoviae*; 13: Controle negativo da reação.

Na figura podemos observar a presença de bandas de fraca intensidade para *S. Enteritidis* e para *A. butzleri*. Tais bandas não são compatíveis aos produtos esperados para *C.coli* e *C. jejuni*, não prejudicando o protocolo. Ainda, pode-se notar na coluna 13, no controle negativo, a presença do marcador de peso molecular, porém sem bandas. O resultado

do teste demonstra a especificidade dos *primers* utilizados para as bactérias pesquisadas nas condições do protocolo aplicado.

Após esses testes foi possível a implantação do protocolo no laboratório. A tabela 07 mostra o protocolo final aplicado no laboratório.

TABELA 07 – Protocolo com os reagentes e concentrações de *m*-PCR para detecção de *C. coli* e *C. jejuni* padronizado no laboratório.

Reagentes	Volume (µL)
Água ultra-pura	16,3 µL
Tampão 10X	2,5 µL
dNTP mix (2 mM)	1,0 µL
MgCl ₂ (2,5 mM)	1,0 µL
<i>Primer Col1</i> (100 pmol)	0,5 µL
<i>Primer Col2</i> (100 pmol)	0,5 µL
<i>Primer Jun3</i> (100 pmol)	0,5 µL
<i>Primer Jun4</i> (100 pmol)	0,5 µL
<i>Taq</i> polimerase (1U)	0,2 µL
DNA	2 µL
Volume total	25

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLOS, B. *Campylobacter jejuni* infections: update on emerging issues and trends. **Clinical Infectious Diseases**. v. 32, p. 1201–1206, 2001.
- ANON. The Community summary report on trends and sources of zoonoses and zoonotic agents in the European Union in 2007. *EFSA J*, 223, 2009. Disponível: EFSA http://www.efsa.europa.eu/EFSA/efsa_locale-1178620753812_1211902269834.htm
- BOLTON, F. J. **Methods for isolation of *Campylobacter* from humans, animals, food and water**. In: The increasing incidence of campylobacteriosis in humans. Report and proceedings of a WHO consultation of experts. Geneva: World Health Organisation. 2001. p. 87-94.
- BORSOI, A., SANTIN, E., SANTOS, L. R., SALLE, C. T.P., MORAES, H.L.S., NASCIMENTO, V.P. Inoculation of newly hatched broiler chicks with two brazilian isolates of *Salmonella* Heidelberg strains with different virulence gene profile, antimicrobial resistance and pulsed field gel electrophoresis pattern to intestinal changes evaluation. **Poultry Science**, v.88, p.750-758, 2009.
- BUTZLER, J. P. *Campylobacter*, from obscurity to celebrity. **Europ. Soc. Of Clin. Microbiol. and Infect. Dis**. v.10. p. 868-876. 2004.
- CARVALHO, A.C.F.B.; LIMA, V.H.C.; PEREIRA, G.T. Determinação dos principais pontos de risco de contaminação de frangos por *Campylobacter*, durante o abate industrial. **Rev. Hig. Alim.**, v.16., p.89-94, 2002.
- 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**. n. 23, pg.11141-56, 1988.
- DON, R.H.; COX, P.T.; WAINWRIGHT, B.J.; BAKER, K.; MATTICK, J.S. Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. **Nucleic Acids Research**. v.19, n. 14, 1991.
- DICKINS, M. A. et al. Diversity of *Campylobacter* isolates from retail poultry carcasses and from humans as demonstrated by pulsed–filed gel electrophoresis. **Journal of Food Protection**. v. 65, p. 957–962, 2002.
- EDWARDS, M.C. AND GIBBS, R.A. *Multiplex* PCR: advantages, development, and applications. **PCR Methods and Applications**. n. 3, pg. S65–S75, 1994.
- ENGLER, M.D.; FEDORKA-CRAY P.J. Evaluation of a commercial diagnostic PCR for the identification of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. **Letters in Applied Microbiology**. 35, 353–356, 2002.
- ERLICH, H.A. PCR technology: principles and applications for DNA amplifications. **Stockton Press**, NY, 1989.

FROST, J.A. Current epidemiological issues in human campylobacteriosis. **Journal of Applied Microbiology**. p. 85S–95S, 2001.

GIESSEN A. VAN DE; J. TILBURG; W. RITMEESTER, J; VAN DE PLAS. Reduction of Campylobacter infections in broiler flocks by application of hygiene measures. **Epidemiol. Infect.** 121:57-66, 1998.

GILBERT M, et al. Evidence for acquisition of the lipopolysaccharide biosynthesis locus in *Campylobacter jejuni* GB 11, a strain isolated from a patient with Guillain–Barre ´ syndrome, by horizontal exchange. **Infect Immun**; v. 72, p. 1162–1165, 2004.

HAZELEGER, W.; ARKESTEIJN, C.; TOOROPBOUMA, A.; BEUMER, R. Detection of the coccoid form of *Campylobacter jejuni* in chicken products with the use of the polymerase chain reaction. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 24, p. 273–281, 1994.

HE, Q., MARJAMÄKI, M., SOINI, H., MERTSOLA, J., AND VILJANEN, M. K. Primers are decisive for sensitivity of PCR. **BioTechniques**. n. 17, p. 82–87, 1994.

HUMPHREY, T.; O’BRIEN, S.; MADSEN, M. Campylobacter as a zoonotic pathogens: A food production perspective. **International Journal of Food Microbiology**. v.117, p. 237–257, 2007.

JACOBS-REITSMA,W. *Campylobacter* in the food supply. **Campylobacter American Society for Microbiology**. Washington, 2nd edition, p. 467-481, 2000.

JONES, D. M.; SUTCLIFFE, E. M.; AND CURRY, A. Recovery of viable but nonculturable *Campylobacter jejuni*. **J. Gen. Microbiol.** n. 137, p. 2477–2482, 1991.

KUANA, S.L. Occurrence and characterization of Campylobater in Brazilian production and processing of broilers. **Avian Diseases**. v. 9, n. 2, p. 480-486, 2008.

LEE, A.; SMITH, S. C. COLOE, P. J. Survival and growth of *Campylobacter jejuni* after artificial inoculation onto chicken skin as a function of temperature and packaging conditions. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.61, n.12, p. 1609-1614, 1998.

MEZEI, L.; STORTS, D.; ERICKSON D.; PEYRUCHAUD, S.; SMITH, R. Web support with Amplification Assistant PCR troubleshooting program. **Promega Notes**. n. 66, pg. 10–13, 1998.

MULLIS, K., FALOONA, F., SCHARF, S., SAIKI, R., HORN, G. AND ERLICH, H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. **Cold Spring Harbor Symposium in Quantitative Biology**. n. 51, pg. 263-7, 1986.

MULLIS, K.; FALOONA, F. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. **Methods Enzymol.** n. 155, pg. 335-350, 1987.

NAIR, B. G.; CHOWDHURY, S.; DAS, P.; PAL, S.; PAL, S. C. Improved preservation medium for *Campylobacter jejuni*. **J. Clin. Microbiol.** n. 19, p. 298–299, 1984.

OLSEN, J.E., ABO, S., HILL, W., NOTERMANS, S., WERNARS, K., GRANUM, P.E., POPOVIC, T., RASMUSSEN, H.N. AND OLSVIK, O. Probes and polymerase chain reaction for detection of food-borne bacterial pathogens. **International Journal of Food Microbiology**. n. 28, pg. 1–78, 1995.

ON, S.L.W. Identification methods for *Campylobacters*, *Helicobacters*, and related organisms. **Clinical Microbiology Reviews**. n. 9, pg. 405–422, 1996.

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

ROLLINS, D. M. e COLWELL, R. R.; Viable but nonculturable satage of *Campylobacter jejuni* and its role in survival in the natural aquatic environment. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 52, p. 531-538, 1986.

ROSENQUIST, H., SOMMER, H.M., NIELSEN, N.L. AND CHRISTENSEN, B.B. The effect of slaughter operations on the contamination of chicken carcasses with thermotolerant *Campylobacter*. **Int J Food Microbiol**. v.108, 226–232, 2006.

ROWE, M. T.; DUNSTALL, G.; KIRK, R.; LOUGHNEY, C. F.; COOKE, J. L.; BROWN, S. R. H. Development of an image system for the study of viable but non-culturable forms of *Campylobacter jejuni* and its use to determine their resistance to disinfectants. **Food Microbiology**, London, v. 15, p. 491-498, 1998.

SAIKI, R., SCHARF, S., FALOONA, F., MULLIS, K., HORN, G., AND ERLICH, H. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**. n. 230, pg. 1350-54, 1985.

SAHA, S. K.; SANYAL, S. C. Better preservation of *Campylobacter jejuni*/*C. coli* in a defined medium. **Indian J. Med. Res**. v. 93, p. 26–28, 1991.

SATSANGI, J.; JEWELL, D. P.; WELSH, K.; BUNCE, M.; AND BELL, J. I. Effect of heparin on polymerase chain reaction. **Lancet**. n. 343, pg. 1509–1510, 1994.

STERN, N. J., KOTULA, A. W. Survival of *Campylobacter jejuni* inoculated into ground beef. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 44, p.1150, 1982.

TRACHOO, N.; FRANK, J. F.; STERN, N. J. Survival of *Campylobacter jejuni* biofilms isolated from chicken houses. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 65, p. 1110-1116, 2002.

WEIJTENS, M.J.B.M.; REINDERS, R.D.; URLINGS, H.A.P.; VAN DER PLAS, J. *Campylobacter* infections in fattening pigs; excretion pattern and genetic diversity. **Journal of Applied Microbiology**. n. 86, p. 63–70, 1999.

VANDAMME P., L.J. VAN DOORN, S.T. AL RASHID, W.G.V. QUINT, J. VAN DER PLAS, V.L. CHAN AND S.L.W. ON. *Campylobacter hyoilei* Alderton et al. 1995 and *Campylobacter coli* Veron and Cahatelain 1973 are subjective synonyms. **Int. J. Syst. Bact.** 1055-1060, 1997.

VAN DOORN, L.-J. et al. Rapid identification of diverse *Campylobacter lari* strains isolated from mussels and oysters using a reverse hybridization line probe assay. **J. Appl. Microbiol.** n. 84, pg. 545–550, 1998.

KEENER, K.M.; BASHOR, M.P.; CURTIS, P.A.; SHELDON, B.W.; KATHARIOU, S. Comprehensive Review of *Campylobacter* and Poultry Processing. **Comprehensive reviews in food science and food safety.** vol. 3, 2004.