



Vigilância Sanitária em Debate:
Sociedade, Ciência & Tecnologia

E-ISSN: 2317-269X

visaemdebate@incqs.fiocruz.br

Instituto Nacional de Controle e
Qualidade em Saúde
Brasil

de Mello Medeiros, Valeria; Lopes Bricio, Silvia Maria; Mandetta Clementino, Maysa
Identificação de *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* isoladas de carcaças
resfriadas de Frango pela Multiplex PCR
Vigilância Sanitária em Debate: Sociedade, Ciência & Tecnologia, vol. 3, núm. 3, agosto,
2015, pp. 97-103
Instituto Nacional de Controle e Qualidade em Saúde

Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=570561423015>

- Como citar este artigo
- Número completo
- Mais artigos
- Home da revista no Redalyc

redalyc.org

Sistema de Informação Científica
Rede de Revistas Científicas da América Latina, Caribe, Espanha e Portugal
Projeto acadêmico sem fins lucrativos desenvolvido no âmbito da iniciativa Acesso Aberto

Identificação de *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* isoladas de carcaças resfriadas de Frango pela Multiplex PCR

Identification of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from refrigerated chicken carcasses by Multiplex PCR

Valeria de Mello Medeiros^{1,*}

Silvia Maria Lopes Bricio¹

Maysa Mandetta Clementino¹

RESUMO

Campylobacter jejuni e *C. coli* constituem as espécies termofílicas mais frequentemente isoladas em casos de enterites humanas, devido à ingestão de alimentos à base de frango mal cozido ou através da contaminação cruzada durante a manipulação de alimentos crus. A diferenciação bioquímica de *C. jejuni* e *C. coli* apresenta inconsistências, como a hidrólise do hipurato e a sensibilidade ao ácido nalidíxico e à cefalotina. Desta forma, a aplicação de métodos moleculares se faz necessário na identificação dessas espécies. O objetivo deste trabalho foi realizar a identificação de *C. jejuni* e *C. coli* isolados de carcaças resfriadas de frango pela Multiplex PCR. Para isso, o gene que codifica uma subunidade de oxirredutase (160 pb) e o gene de virulência *ceuE* (894 pb) específicos para *C. jejuni* e *C. coli*, respectivamente, foram submetidos a PCR, simultaneamente. Dos 21 isolados analisados pela bioquímica, 19 (90,48%) foram identificados como *C. jejuni* um (4,76%) como *C. coli* e um (4,76%) não identificado. A Multiplex PCR confirmou a presença de 90,48% de *C. jejuni* e 9,52% de *C. coli*. A abordagem proposta apresentou rapidez, sensibilidade e especificidade e, assim, poderia ser considerada uma boa alternativa para ensaios clínicos de rotina e estudos epidemiológicos.

PALAVRAS-CHAVE: *Campylobacter jejuni*; *Campylobacter coli*; Multiplex PCR

ABSTRACT

Campylobacter jejuni and *C. coli* are the most frequently identified thermophilic species in cases of human enteritis caused by the consumption of food products made with undercooked chicken or cross-contamination during handling of raw food products. The biochemical differentiation of *C. jejuni* and *C. coli* shows inconsistencies, such as hippurate hydrolysis and sensitivity to nalidixic acid and cephalothin. Consequently, the use of molecular methods is necessary to identify these species. The objective of this study was to identify *C. jejuni* and *C. coli* isolates from refrigerated chicken carcasses using multiplex PCR. For this purpose, the genes encoding a 160-bp subunit of oxidoreductase and the 894-bp *ceuE* virulence gene specific for *C. jejuni* and *C. coli*, respectively, were concurrently subjected to PCR. Of the 21 isolates assessed biochemically, 19 (90.48%) were identified as *C. jejuni*, one (4.76%) as *C. coli*, and one (4.76%) was not identified. Multiplex PCR confirmed the presence of 90.48% *C. jejuni* and 9.52% *C. coli*. The proposed approach was rapid, sensitive, and specific and is a good alternative for routine clinical testing and epidemiological studies.

¹ Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz (INCQS/Fiocruz), Rio de Janeiro, RJ, Brasil

* E-mail: valeria.medeiros@incqs.fiocruz.br

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

Recebido: 27 Ago 2014

Aprovado: 1 Dez 2014



INTRODUÇÃO

Nas últimas quatro décadas, as espécies de *Campylobacter* spp. têm sido reconhecidas como patógenos emergentes e dispon-taram como importantes agentes de gastroenterites de origem alimentar em várias partes do mundo¹. Espécies do gênero *Campylobacter* estão amplamente distribuídas na natureza e a maioria está apta a habitar o trato intestinal de animais de sangue quente, sendo encontradas frequentemente em aves domésticas, bovinos, suínos, ovinos, roedores, pássaros, cães e gatos. É importante ressaltar que frangos são considerados os maiores reservatórios de espécies termofílicas que suportam a temperatura do trato intestinal das aves, em torno de 41°C². Muitas espécies podem ser isoladas de água, leite, carnes, vegetais, moluscos e areias de praia^{3,4}. Além disso, as espécies termofílicas, principalmente *Campylobacter jejuni*, representam um dos mais importantes enteropatógenos, especialmente nos países desenvolvidos^{5,6}.

A contaminação de carcaças de frangos durante o abate, o consumo de alimentos à base de frango mal cozido, além da contaminação cruzada durante a manipulação de alimentos crus são considerados como os principais fatores de risco para infecções^{7,8}.

O gênero *Campylobacter* é composto atualmente de 32 espécies e 13 subespécies⁹. As espécies *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter lari* e *Campylobacter upsaliensis* representam o grupo denominado termofílico, devido à temperatura ótima de crescimento ser entre 42°C e 43°C, sendo que *C. jejuni* e *C. coli* constituem as espécies mais frequentemente isoladas de enterites humanas^{10,11,12}.

Estudos mostraram o isolamento de *Campylobacter* spp. em 66,6% das amostras de carcaças de frango adquiridas em pontos de processamento na Croácia e 68,1% de *Campylobacter* termotolerantes em amostras de frango na Etiópia^{13,14}. Resultados superiores foram obtidos na Eslovênia onde 81,8% das 33 amostras de coxas e fígado de frango continham *Campylobacter* termotolerantes¹⁵. Já em Lisboa, 100% das 21 amostras de peito de frango resfriado e embalado para consumo estavam contaminadas com *Campylobacter* spp¹⁶.

Campylobacter jejuni tem sido identificado como um dos principais patógenos no desencadeamento da síndrome de Guillain Barré (SGB), uma paralisia flácida que acomete primordialmente a mielina da porção proximal dos nervos periféricos de forma aguda e subaguda. Aproximadamente 60-70% dos pacientes com SGB apresentam alguma doença precedente, sendo a infecção por *C. jejuni* a mais frequente delas (32%)¹⁷.

Vários estudos no Brasil têm demonstrado a presença de *Campylobacter* spp. em carne de frango. Na região sul do Brasil foi encontrado índices de 81,8% e 91,7% em amostras de aves destinadas ao abate^{18,19}. Análises em carnes e miúdos de frango expostos ao consumo em Belém do Pará também apresentaram 93,7% de amostras contaminadas com *Campylobacter* spp²⁰.

As espécies *Campylobacter jejuni* e *C. coli* compartilham muitas características clínicas e, portanto, a caracterização e diferenciação desses enteropatógenos representam um passo crucial para a definição do seu espectro de doenças, bem como para fins epidemiológicos¹¹. A diferenciação bioquímica de *Campylobacter jejuni* e *C. coli* é baseada na hidrólise do hipurato, uma vez que apenas o *C. jejuni* possui a enzima hipuricase²¹. Apesar do gene que codifica esta enzima estar presente em *C. Jejuni*, existem algumas cepas que não expressam a enzima para esta reação^{21,22}.

Desta forma, a aplicação de métodos moleculares se faz necessária na elucidação da identificação das espécies²³. A rápida detecção de *C. jejuni* em alimentos é considerada fundamental, não só para reduzir o tempo na tomada de medidas adequadas como a remoção de alimentos contaminados aos consumidores, mas também na rapidez do diagnóstico e tratamento²⁴.

A abordagem de detecção simultânea de *C. jejuni* e *C. coli* pelo desenvolvimento de Multiplex PCR baseada na amplificação do gene *ceuE* foi proposta anteriormente²⁵. As duas espécies apresentam 86,9% de similaridade e, assim, permitiram o desenho de iniciadores específicos²⁵. O gene *ceuE* codifica uma lipoproteína de 34,5 a 36,2 kDa, presente no sistema de transporte de sideróforos, envolvido na aquisição de ferro e que é um aspecto crucial na infectividade. Esse sistema parece ser importante na virulência de *C. jejuni* e *C. coli*¹¹. Estudos posteriores propuseram a detecção simultânea de genes *flaA* (flagelina) e da subunidade da oxirredutase, dos genes *cadF* (proteína CadF, fator de virulência), *hipO* (hipuricase), e do gene *asp* (aspartokinase) na diferenciação de *C. jejuni* e *C. coli*^{26,27}. A amplificação do gene *lpxA* (UDP-N-acetylglucosamine acyltransferase), utilizando oligonucleotídeos distintos, demonstrou especificidade na diferenciação de *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* e *C. upsaliensis* em uma Multiplex PCR²⁸.

Considerando as limitações da identificação convencional e da importância da diferenciação de *C. coli* e *C. jejuni* no controle da qualidade de carcaças de frango, o objetivo do estudo foi estabelecer uma Multiplex PCR utilizando uma nova combinação de genes espécie-específicos e de virulência.

METODOLOGIA

Amostragem e Processamento das amostras

No período de julho de 2009 a julho de 2010, foram obtidos 21 isolados de *Campylobacter* spp. de 30 amostras de carcaças refrigeradas de frango de diferentes marcas comercializadas na cidade do Rio de Janeiro. As amostras foram analisadas no Setor Alimentos, do Departamento de Microbiologia do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em saúde da Fundação Oswaldo Cruz (INCQS/FIOCRUZ), de acordo com metodologia oficial⁷.

Ensaio presuntivo e ensaio confirmativo

Os 21 isolados foram submetidos à coloração de Gram e aos testes de catalase e oxidase. Para confirmação do gênero *Campylobacter*



foi utilizado o teste de aglutinação em látex pelo kit Dryspot *Campylobacter* (Oxoid®), de acordo com instruções do fabricante.

Identificação Bioquímica

A susceptibilidade ao ácido nalidíxico e à cefalotina, avaliadas pelo método de difusão em disco, e a hidrólise do hipurato foram realizadas segundo a ISO 10272-1:2006²⁹.

Identificação Molecular

O DNA genômico dos isolados e cepas de referência foi extraído pelo kit comercial Quiagen (Quiagen Ltd., Dorking, Reino Unido) e quantificado no equipamento Qubit 2.0 Fluorometer (Invitrogen®), de acordo com as instruções do fabricante.

Multiplex PCR

As reações da PCR foram realizadas em um volume total de 25 µl contendo: 50 ng de DNA dos isolados e das cepas de referência, 100 mM de Tris-HCl, 50 mM de KCl, 200 mM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP); 1,7 mM de MgCl₂; 2,0 U de Taq DNA polimerase e 20 picomol de cada iniciador (Tabela 1). Foram utilizados *C. jejuni* INCQS 00262 (ATCC 33560) e *C. coli* INCQS 00263 (ATCC 33559) como controles positivos e *E. coli* INCQS 00033 (ATCC 25922) como controle negativo. A reação foi realizada no termociclador Eppendorf EP Mestre Cycler utilizando o ciclo: desnaturação inicial a 94°C durante 4 minutos seguido de 25 ciclos de amplificação. Cada reação consistiu de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 53°C e 1 minuto a 72°C, finalizando com um passo de extensão do iniciador de 5 minutos a 72°C. Os produtos da PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose a 2,0% em tampão TBE [1,0 M tris, ácido bórico 0,01 M, 0,01 M EDTA pH 8,2 (Invitrogen)], incluindo a escala de 100 pb como marcador de peso molecular (Invitrogen). O gel de agarose foi corado com uma solução de brometo de etídio (10,0 mg / mL) e visualizados sob luz UV, no aparelho de transiluminação GE ImageQuant 300.

A especificidade foi verificada pela Multiplex PCR com DNA de *C. jejuni* INCQS 00262 (ATCC 33560) e *C. coli* INCQS 00263 (ATCC 33559), como controles positivos e *E. coli* INCQS 00033 (ATCC 25922), como controle negativo. A especificidade frente a outras espécies do gênero *Campylobacter* e da família Enterobacteriaceae foi checada *in silico* no programa “*In silico* PCR amplification” (<http://insilico.ehu.es/PCR/>). A sensibilidade da Multiplex PCR foi avaliada utilizando DNA genômico de *C. jejuni* INCQS 00262 (ATCC 33560) e *C. coli* INCQS 00263 (ATCC 33559) diluídos serialmente a 1:10 de 40 ng a 4 pg. A seguir, foi aplicada esta Multiplex PCR para os 21 isolados.

RESULTADOS

Ensaio presuntivo e confirmativo

As características morfo-tintoriais demonstraram a presença de bacilos Gram negativos finos em forma de “gaivota” compatíveis com o gênero *Campylobacter* nos 21 isolados. Todos os isolados apresentaram as enzimas catalase e oxidase e aglutinaram as partículas de látex azul sensibilizadas com anticorpos de coelho.

Identificação Bioquímica

Em relação à susceptibilidade ao ácido nalidíxico e à cefalotina, dezesseis isolados (76,2%) apresentaram resultados diferentes da literatura, onde *C. jejuni* e *C. coli* são sensíveis ao ácido nalidíxico e resistentes a cefalotina. Dezoito isolados (85,72%) foram hipurato-positivo, sendo identificados como *C. jejuni*, enquanto dois isolados (9,52%) apresentaram-se como hipurato-negativo e foram identificados como *C. coli*. Apenas um isolado (4,76%) apresentou resultado duvidoso em relação à hidrólise do hipurato e foi considerado *C. coli*. Onze isolados (52,4%) apresentaram resistência aos dois antibióticos, no entanto, dez foram positivos no teste da hidrólise do hipurato e foram classificadas como *C. jejuni* resistentes ao ácido nalidíxico. O isolado negativo na hidrólise do hipurato foi identificado como *C. coli* resistente ao ácido nalidíxico.

Multiplex PCR

A especificidade da Multiplex PCR com cepas de referência demonstrou a presença de um fragmento de 159 pb frente a *C. jejuni*, um fragmento de 894 pb frente a *C. coli* e ausência de amplificação frente a *E. coli* (Figura 2). A análise da especificidade *in silico* também apresentou fragmento 159 pb em 17 genomas de *C. jejuni* e 894 pb em três genomas de *C. coli*. As espécies *C. fetus*, *C. hominis*, *C. curvus*, *C. concisus*, *C. lari* e *Campylobacter* sp. não apresentaram fragmentos (Tabela 2). Não foram observados fragmentos nas análises *in silico* com genomas de espécies da família Enterobacteriaceae.

A sensibilidade da Multiplex PCR resultou na amplificação dos genes da oxirredutase e *ceuE* até 40 pg de DNA (Figura 1). A Multiplex PCR dos 21 isolados demonstrou, dezenove isolados (90,48%) como *C. jejuni* e dois (9,52%) como *C. coli* (Figura 2).

Discussão

Nas últimas quatro décadas, as espécies de *Campylobacter* spp. têm sido reconhecidas como organismos emergentes, importantes agentes de gastroenterites de origem alimentar em várias partes do mundo¹.

Tabela 1. Iniciadores utilizados na identificação das espécies *C. jejuni* e *C. coli* por Multiplex PCR.

Iniciadores	Gene	Espécie alvo	Produto (pb)	Oligonucleotídeos (5' - 3')	Referência
Col1_F Col2_R	<i>CeuE</i>	<i>C. coli</i>	894	ATGAAAAATATTTAGTTTTTGCA ATTTTATTATTGTAGCAGCG	Gonzales et al. 1997
C - 1 C - 4	Oxirredutase	<i>C. jejuni</i>	159	CAATAAAGTTAGAGGTAGAATGT GGATAAGCACTAGCTAGCTGAT	Winters and Slavik, 1995

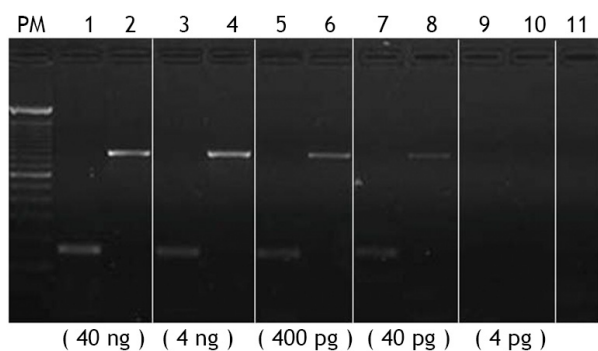


Figura 1. Sensibilidade da multiplex PCR, genes oxireductase (894 bp) e *ceuE* (159bp) (PM). Peso Molecular 100 pb; (1-2) *Campylobacter jejuni* INCQS 00262 (ATCC 33560) e *C.coli* INCQS 00263 (ATCC 33559) - 40 ng; (3-4) *C.j* e *C.c.*, 4 ng; (5-6) *C.j* e *C.c.*, 400 pg; (7-8) *C.j* e *C.c.*, 40 pg; (9-10) *C.j* e *C.c.*, 4 pg; (11) H_2O (controle negativo).

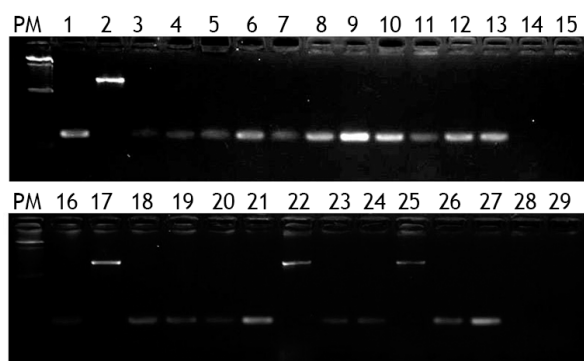


Figura 2. Multiplex PCR dos 21 isolados, genes oxireductase (894 bp) e *ceuE* (159bp). (PM) Peso Molecular 100 pb. (1 e 16) *C. jejuni* INCQS 00262 (ATCC 33560); (2 e 17) *C. coli* INCQS 00263 (ATCC 33559); (3-13) *C. jejuni*; (14 e 28) *E coli* INCQS 00033 (ATCC 25922); (15 e 29) H_2O (controle negativo); (18-21) *C. jejuni*; (22 e 25) *C. coli*; (23, 24, 26 e 27) *C. jejuni*.

Neste estudo, 70% das carcaças resfriadas de frango analisadas demonstraram a presença de *Campylobacter* spp. Outros estudos vêm relatando percentuais superiores e inferiores ao encontrado nesta investigação^{2,19,20,30}. A recuperação de *Campylobacter* spp. em carne de ave resfriada pode estar associada aos métodos de análise e ou a outros fatores como congelamento, presença de aditivos, microbiota acompanhante, tensão de oxigênio e concentração de cloro na água, que podem influenciar no isolamento^{31,32,33}.

A susceptibilidade ao ácido nalidixico e à cefalotina é considerada característica taxonômica diferencial entre espécies termofílicas do gênero *Campylobacter*. No entanto, os resultados obtidos neste estudo, bem como, aqueles encontrados em outro estudo no qual 4,8% de *C. coli* e *C. jejuni* foram resistentes ao ácido nalidixico, demonstram a inconsistência desse marcador³⁴. A resistência aos antimicrobianos está associada a muitos fatores relacionados à expressão de genes de resistência; a presença de elementos móveis como plasmídeos contendo genes de resistência; além das altas taxas de transferência lateral de genes.

Tabela 2. Amplificação por PCR *In silico* dos genes oxireductase e *ceuE* de espécies da família Campylobacteriaceae.

	Espécies da família Campylobacteriaceae	Gene <i>CeuE</i> pb*	Gene Oxireductase pb*
1.	<i>C. coli</i> 15-537360	894	-
2.	<i>C. coli</i> 76339	894	-
3.	<i>C. coli</i> CVM N29710	894	-
4.	<i>C. concisus</i> 13826	-	-
5.	<i>C. curvus</i> 525.92	-	-
6.	<i>C. fetus</i> subsp. <i>Fetus</i> 82-40	-	-
7.	<i>C. hominis</i> ATCC BAA-381	-	-
8.	<i>C. jejuni</i> 32488	-	159
9.	<i>C. jejuni</i> 4031	-	159
10.	<i>C. jejuni</i> RM 1221	-	159
11.	<i>C. jejuni</i> subsp. <i>doylei</i> 269.97	-	159
12.	<i>C. jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i> 00-2425	-	159
13.	<i>C. jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i> 00-2426	-	159
14.	<i>C. jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i> 00-2538	-	159
15.	<i>C. jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i> 00-2544	-	159
16.	<i>C. jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i> 81-176	-	159
17.	<i>C. jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i> 81116	-	159
18.	<i>C. jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i> IA3902	-	159
19.	<i>C. jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i> ICDCJ07001	-	159
20.	<i>C. jejuni</i> subsp. <i>Jejuni</i> M1	-	159
21.	<i>C. jejuni</i> subsp. <i>Jejuni</i> NCTC 11168	-	159
22.	<i>C. jejuni</i> subsp. <i>Jejuni</i> NCTC 11168-BN148	-	159
23.	<i>C. jejuni</i> subsp. <i>Jejuni</i> PT14	-	159
24.	<i>C. jejuni</i> subsp. <i>Jejuni</i> S3	-	159
25.	<i>C. lari</i> RM 2100	-	-
26.	<i>Campylobacter</i> sp. 03-427	-	-

* pb - pares de base

A utilização de métodos convencionais como provas bioquímicas são muitas vezes demorados e limitados na diferenciação das espécies. Dentre estes testes bioquímicos, a hidrólise de hipurato de sódio é o único utilizado na diferenciação de *C. jejuni* e *C. coli*.

Muitos laboratórios avaliam linhagens hipurato negativo de acordo com a resistência ao ácido nalidixico e cefalotina para a diferenciação das espécies *C. lari* e *C. upsaliensis*. No entanto, muitos estudos já revelaram que este procedimento não proporciona uma correta identificação de *C. jejuni* hipurato negativo. Estas cepas vêm sendo identificadas, de forma confiável, por meio da detecção de genes espécie específicos^{35,36}. Resultados falso-positivos em testes hipurato também foram relatados, o que sugere que até mesmo isolados hipurato positivos podem não ser confiáveis^{37,38}.

Discrepâncias entre o teste bioquímico do hipurato e a especificação pela PCR vem sendo descritas^{38,39}. Linhagens de *C. jejuni* apresentaram o gene *hipO*, porém não expressaram reação enzimática⁴⁰. Além disso, isolados de *C. coli* que não apresentaram o gene *hipO* pela PCR demonstraram atividade



enzimática para hipurato⁴¹. Isso pode ser explicado pela presença de um outro gene (não *hipO*) codificando a enzima ou, até mesmo, a presença de outra enzima com atividade similar capaz de hidrolisar o hipurato²⁷.

Esta dificuldade também foi verificada por outros pesquisadores, que compararam os resultados obtidos entre o teste de hidrólise do hipurato e a Multiplex PCR^{38,39}. O estudo de Nakari e colaboradores⁴¹ verificou que 11% das amostras analisadas apresentaram hipurato positivo, no entanto, 39% dos isolados foram identificadas como *C. jejuni* por meio da Multiplex PCR, demonstrando assim uma maior sensibilidade na caracterização das espécies.

A presença de reações bioquímicas e ou perfis de resistência atípicos em 76,2% dos isolados analisados neste estudo, levou à necessidade da aplicação de metodologia molecular na certificação dos mesmos. Essas inconsistências têm levado o desenvolvimento de abordagens voltadas à identificação e diferenciação de espécies termofílicas do gênero *Campylobacter* por meio de PCR simples ou pela Multiplex PCR^{25,28,42}.

Neste estudo, a amplificação simultânea dos genes *ceuE* e o gene de uma subunidade da oxirredutase de *C. coli* e *C. jejuni*, respectivamente, foi consistente e específica para identificação das 2 espécies. Um estudo anterior também utilizou esses genes, além do gene *cadF* (fator de virulência) para detecção de *Campylobacter* spp.⁴². Enquanto os genes *ceuE* e oxirredutase foram específicos e reprodutíveis, o gene *cadF* apresentou inespecificidade, sendo detectado em *Enterococcus casseliflavus* ATCC 25788 e *Pasteurella aerogenes* ATCC 29554⁴². Um outro estudo utilizou os genes *hipO* (*C. jejuni*), *asp* (*C. coli*) e *cadF* (*Campylobacter* spp.) e demonstrou a especificidade da Multiplex PCR proposta, apesar de citar a presença de inespecificidade do gene *cadF* apontado no estudo anterior^{27,42}. Outros genes propostos

para a diferenciação de *C. jejuni* e *C. coli* como o gene da flagelina (*flaA*) e do gene 16S rRNA também apresentaram problemas na discriminação entre estas espécies¹¹.

Considerando a relevância desse enteropatógeno alimentar, a implementação de métodos eficazes e rápidos na sua detecção, contribuirá para a aplicação de sistemas de segurança alimentar baseados no controle de qualidade da carne de frango, devido ao seu grande consumo e o impacto na saúde pública.

CONCLUSÕES

As espécies termofílicas *C. jejuni* e *C. coli* são responsáveis por estimadamente 400 milhões de casos de gastroenterite humana, tanto em países desenvolvidos quanto em países em desenvolvimento, o que as tornam a causa mais importante de doença bacteriana transmitida por alimentos, superando doenças entéricas causadas por *Salmonella* sp., *Shigella* sp. e *Escherichia coli*, representando um dos mais importantes enteropatógenos para a saúde pública.

A Multiplex PCR estabelecida no presente estudo foi sensível, específica e reprodutível e possibilitou a identificação correta de espécies que revelaram resultados duvidosos quanto à susceptibilidade ao ácido nalidíxico e cefalotina e na hidrólise do hipurato de sódio. Além disso, ofereceu a vantagem de identificar os isolados em aproximadamente 4 horas após a obtenção do DNA genômico. Adicionalmente, a aplicação de metodologia molecular pode ser considerada uma ferramenta essencial na investigação epidemiológica em relação à colonização de *Campylobacter* em alimentos.

Os resultados obtidos demonstraram rapidez, sensibilidade e especificidade na detecção de *C. jejuni* e *C. coli*, e assim, pode ser considerada uma boa alternativa também para ensaios clínicos de rotina e estudos epidemiológicos.

REFERÊNCIAS

1. Butzler JP. *Campylobacter*, from obscurity to celebrity. Clin Microbiol Infections 2004; 10(10):868-76. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2004.00983.x>
2. Cortez ALL, Carvalho AC, Scarcelli E, Miyashiro S, Vidal-Martins AM, Burger KP. Survey of chicken abattoir for the presence of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. Rev Inst Med Trop São Paulo. 2006;48(6):307-10. <http://dx.doi.org/10.1590/S0036-46652006000600001>
3. Maier LM, Oliveira VR, Rezende KCR, Vieira VDR, Carvalho CR. Avaliação da presença de fungos e bactérias patogênicas nas areias de duas praias de baixo hidrodinamismo e alta ocupação humana no litoral do município do Rio de Janeiro. Col Est Cariocas. 2003;(200030701).
4. Nachamkin I. *Campylobacter jejuni*. In: Doyle MP, Beuchat LR, Montville TJ. Food microbiology: fundamentals and frontiers. Washington, DC: ASM; 2001. p. 179-92.
5. Allos BM, Blaser MJ. *Campylobacter jejuni* and the expanding spectrum of related infections. Clin Infect Dis. 1995;20(5):1092-101. <http://dx.doi.org/10.1093/clinids/20.5.1092>
6. Rohner P, Pittet D, Pepey B, Nije-Kinge T, Auckenthaler R. Etiological agents of infectious diarrhea: implications for requests for microbial culture. J Clin Microbiol. 1997;35(6):1427-32.
7. Stern NJ, Line JE, Chen H-C. *Campylobacter* in: Downes FP, Ito K. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. Washington, DC: Apha; 2001. p. 301-10.
8. Rozynek E, Dzierzanowska-Frangat K, Jozwiak P, Popowski J, Korsak D, Dzierzanowska D. Prevalence of potential virulence markers in Polish *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates obtained from hospitalized children and from chicken carcasses. J Med Microbiol. 2005;54(Pt 7):615-9. <http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.45988-0>



9. Euzéby JP. Genus *Campylobacter*. LPSN bacterio.net. List of prokaryotic names with standing in nomenclature. 1997 [acesso em 21 ago. 2014]. Disponível em: <http://www.bacterio.cict.fr/c/campylobacter.html>.
10. Rees, JH, Soudain SE, Gregson NA, Hughes RA. *Campylobacter jejuni* Infection and Guillain-Barré Syndrome. *N Engl J of Med*. 1995;333(21):1374-9. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJM199511233332102>
11. Gonzalez I, Grant KA, Richardson PT, Park SF, Collins MD. Specific Identification of the Enteropathogens *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by using test based on the *ceuE* Gene Encoding a Putative Virulence Determinant. *J Clin Microbiol*. 1997;35(3):759-63.
12. Moore JE, Caldwell PS, Millar BC, Murphy PG. Occurrence of *Campylobacter* spp. in water in Northern Ireland: implications for public health. *Ulster Med J*. 2001;70(2):102-7.
13. Granić K., Krčar D, Uhitil S, Jakšić S. Determination of *Campylobacter* spp. in poultry slaughterhouses and poultry meat. *Vet Arhiv*. 2009;79(5):491-7.
14. Kassa T, Gebre-selassie S, Asrat D. The prevalence of thermotolerant *Campylobacter* species in food animals in Jimma Zone, southwest Ethiopia. *Ethiop J Health Dev*. 2005;19(3):225-9.
15. Zorman T, Mozina SS. Classical and molecular identification of thermotolerant *Campylobacters* from poultry meat. *Food Technol Biotechnol* 2002;40(3):177-84.
16. Simões AMM. Avaliação da contaminação por *Campylobacter* spp. em peitos de frango embalados em atmosfera protetora e em superfícies do ambiente fabril [dissertação]. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa; 2010.
17. Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Atenção à Saúde. Portaria nº 497, de 23 de dezembro de 2009. [Aprova o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas Síndrome de Guillain-Barré]. *Diário Oficial União*. 12 set 2007.
18. Kuana SL. *Campylobacter* na produção e processamento de frangos de corte: prevalência, contagem, fatores de risco e perfil de resistência antimicrobiana. *Acta Sci Vet* 2005;33(1):93-4.
19. Franchin PR, Aidoo KE, Batista CRV. Sources of poultry meat contamination with thermophilic *Campylobacter* before slaughter. *Braz J Microbiol*. 2005;36(2):157-62. <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822005000200011>
20. Freitas JA, Noronha GN. Ocorrência de *Campylobacter* spp. em carne e miúdos de frango expostos ao consumo em Belém, Pará. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 2007;59(3):813-5. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-09352007000300038>
21. Totten PA, Patton CM, Tenover FC, Barrett Tj, Stamm WE, Steigerwalt AG et al. Prevalence and characterization of hippurate-negative *Campylobacter jejuni* in King County, Washington. *J Clin Microbiol*. 1987;25(9):1747-52.
22. Miller RS, Speegle L, Oyarzabal OA. DNA identification and characterization of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from caecal samples of chickens in Grenada. *J Appl Microbiol*. 2009;108(3):1041-9.
23. Englen MD, Kelley LCA. Rapid DNA isolation procedure for the identification of *Campylobacter jejuni* by the polymerase chain reaction. *Lett Appl Microbiol*. 2000;31(6):421-6. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.00841.x>
24. Winters DK, Slavik MF. Evaluation of a PCR based assay for specific detection of *Campylobacter jejuni* in chicken washes. *Mol Cell Probes*. 1995;9(5):307-10. [http://dx.doi.org/10.1016/S0890-8508\(95\)91556-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0890-8508(95)91556-7)
25. Houg HS, Sethabutr O, Nirdnoy W, Katz DE, 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*. 2001;40(1-2):11-9. [http://dx.doi.org/10.1016/S0732-8893\(01\)00251-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0732-8893(01)00251-6)
26. Aquino MH, Mangia AHR, Filgueiras ALL, Teixeira LM, Ferreira MC, Tibana A. Use of a multiplex PCR-based assay to differentiate *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* strains isolated from human and animal sources. *Vet J*. 2002;163(1):102-4. <http://dx.doi.org/10.1053/tvj.2001.0632>
27. Al Amri A, Senok AC, Ismaeel AY, Al-Mahmeed AE, Botta GA1. Multiplex PCR for direct identification of *Campylobacter* spp. in human and chicken stools. *J Med Microbiol*. 2007;56(10):1350-5. <http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.47220-0>
28. Klena JD, Parker CT, Knibb K, Ibbitt JC, Devane PM, Horn ST, et al. Differentiation of *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter lari*, and *Campylobacter upsaliensis* by a multiplex PCR developed from the nucleotide sequence of the *lipid A* gene *lpxA*. *J Clin Microbiol*. 2004;42(12):5549-57. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.42.12.5549-5557.2004>
29. International Organisation for Standardisation – ISO. ISO 10272-1:2006: microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection and enumeration of *Campylobacter* spp. Part 1: Detection method; Part 2: Colony count technique. Geneva: International Organisation for Standardisation; 2006.
30. Scarcelli E, Miyashiro S, Campos FR, Castro AGM, Tessari ENC, Cardoso ALSP. Detecção de *Campylobacter jejuni* em carcaças e cortes de frango pela reação da polimerase em cadeia. *Hig Alim*. 2005;19(129):71-6.
31. Kuana SL, Santos LR, Beatriz L, Salle CTP, Moraes HLS, Nascimento VP. Ocorrência de *Campylobacter* em Lotes de frangos de corte e nas carcaças correspondentes. *Ciênc Anim Bras*. 2008;9(2):480-6.
32. Johnsen G, Kruse H, Hofshagen M. Genotyping of *Campylobacter jejuni* from broiler carcasses and slaughterhouse environment by amplified fragment length polymorphism. *Poult Sci*. 2006;85(12):2278-84. <http://dx.doi.org/10.1093/ps/85.12.2278>
33. Medeiros VM. Implantação de metodologia de pesquisa de *Campylobacter* spp. no Setor de Alimentos do Departamento de Microbiologia do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Rio de Janeiro [monografia]. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz; 2009.



34. Vilardo MCB, Thomé JDS, Esteves WTC, Filgueiras ALL, Oliveira SS. Application of biochemical and polymerase chain reaction assays for identification of *Campylobacter* isolates from non-human primates. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006;101(5):499-501. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762006000500003>
35. Denis M, Soumet C, Rivoal K, Ermel G, Blivet D, Salvat G et al. Development of a m-PCR assay for simultaneous identification of *Campylobacter jejuni* and *C. coli*. *Lett Appl Microbiol*. 1999;29(6):406-10. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1472-765X.1999.00658.x>
36. Steinhäuserova I, Ceskova J, Fojtikova K, Obrovská I. Identification of thermophilic *Campylobacter* spp. by phenotypic and molecular methods. *J Appl Microbiol*. 2001;90(3):470-5. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01267.x>
37. Cacho JB, Aguirre PM, Hernanz A, Velasco AC. Evaluation of a disk method for Detection of hippurate hydrolysis by *Campylobacter* spp. *J Clin Microbiol*. 1989; 27(2):359-60.
38. Nicholson MA, Patton CM. Evaluation of disk method for hippurate hydrolysis by *Campylobacter* species. *J Clin Microbiol*. 1995;33(5):1341-3.
39. Wainø M, Bang DD, Lund M, Nordentoft S, Andersen JS, Pedersen K, et al. Identification of campylobacteria isolated from Danish broilers by phenotypic tests and species-specific PCR assays. *J Appl Microbiol*. 2003;95(4):649-55. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.01996.x>
40. Rautelin H, Jusufovic J, Hanninen ML. Identification of hippurate-negative thermophilic campylobacters. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 1999;35(1):9-12. [http://dx.doi.org/10.1016/S0732-8893\(99\)00057-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0732-8893(99)00057-7)
41. Nakari UM, Puhakka A, Siitonen A. CorreCt identification and discrimination between *Campylobacter jejuni* and *C. coli* by a standardized hippurate test and species-specific polymerase chain reaction. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2008;27(7):513-8. <http://dx.doi.org/10.1007/s10096-008-0467-9>
42. Nayak R, Stewart TM, Nawaz MS. PCR identification of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* by partial sequencing of virulence genes. *Mol Cell Probes*. 2005;19(3):187-93. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mcp.2004.11.005>



Esta publicação está sob a licença Creative Commons Atribuição 3.0 não Adaptada.
Para ver uma cópia desta licença, visite http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/deed.pt_BR.