

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE LEITE E
DERIVADOS

Amanda Gonelli Gonçalves

Padronização de PCR para detecção direta e diferenciação de espécies de *Campylobacter* em
Queijo Minas Artesanal

Juiz de Fora

2018

Amanda Gonelli Gonçalves

Padronização de PCR para detecção direta e diferenciação de espécies de *Campylobacter* em Queijo Minas Artesanal

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Leite e Derivados, da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial a obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Leite e Derivados.

Orientador: Prof. Dr. Márcio Roberto Silva

Co-orientadores: Prof. Dr. João Batista Ribeiro

Prof. Dr. Humberto Moreira Húngaro

Juiz de Fora

2018

Gonçalves, Amanda Gonelli.

Padronização de PCR para detecção direta e diferenciação de espécies de *Campylobacter* em Queijo Minas Artesanal / Amanda Gonelli Gonçalves. -- 2018.

89 p. : il.

Orientador: Márcio Roberto Silva

Coorientadores: João Batista Ribeiro, Humberto Moreira Húngaro

Dissertação (mestrado profissional) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados, 2018.

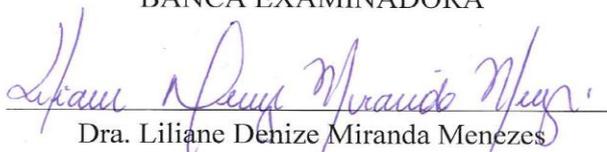
1. *Campylobacter* spp.. 2. PCR multiplex. 3. Queijo Minas Artesanal. 4. Serro. I. Silva, Márcio Roberto, orient. II. Ribeiro, João Batista, coorient. III. Húngaro, Humberto Moreira, coorient. IV. Título.

Amanda Gonelli Gonçalves

Padronização de PCR para detecção direta e diferenciação de espécies de *Campylobacter* em Queijo Minas Artesanal

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Leite e Derivados, da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial a obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Leite e Derivados.

BANCA EXAMINADORA



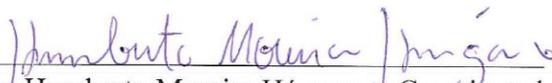
Dra. Liliâne Denize Miranda Menezes
Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA)



Prof. Dr. Márcio Roberto Silva - Orientador
EMBRAPA Gado de Leite



Prof. Dr. João Batista Ribeiro – Co-orientador
EMBRAPA Gado de Leite



Prof. Dr. Humberto Moreira Húngaro – Co-orientador
Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF)



Prof. Dra. Vanessa Aglaê Martins Teodoro
Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF)

Aos meu pais **Hitamar e Rita**, à minha
irmã **Letícia**, ao meu sobrinho **Lucca** e
ao meu namorado **Wagner**, que são o
significado de AMOR na minha vida.

Dedico

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, por me sustentar até aqui e por me mostrar que, apesar de eu ser uma filha imperfeita, o seu amor por mim é infinito.

Aos meus pais, **Hitamar e Rita**, por me incentivarem a ser melhor, pelo apoio em todas as minhas escolhas e por nunca medirem esforços para ajudar a nossa família.

À minha irmã **Letícia**, dona do coração mais lindo desse mundo, por ser paciente comigo nos momentos de estresse. Ao meu sobrinho **Lucca**, por ser a alegria da nossa casa.

Ao meu namorado **Wagner**, por ser meu equilíbrio, meu companheiro, meu amor e por sempre torcer pelas minhas conquistas.

Aos meus **amigos** e à "**família por escolha**", pelo pensamento positivo para que no final tudo desse certo.

À empresa **Tate and Lyle Gemacom Tech**, principalmente à minha ex-gerente **Débora Freitas** e aos colaboradores do **Laboratório de Análise de Produtos**, por terem sido tão compreensivos com a minha ausência nos dias de aula do mestrado.

Ao **Hospital Universitário de Juiz de Fora** e à minha chefe maravilhosa **Eunice Baeta**, por ajustarem o meu horário de trabalho para que fosse possível a realização dos experimentos.

À **Universidade Federal de Juiz de Fora**, por me proporcionar oportunidades que contribuíram para o meu crescimento profissional.

Ao **Laboratório de Análise de Alimentos e Águas** por cederem infraestrutura e materiais necessários para a execução desse trabalho.

À **Embrapa Gado de Leite** e ao **Laboratório de Microbiologia do Leite** por tornarem possível o meu aprendizado no mundo da Biologia Molecular.

Ao orientador **Prof. Dr. Márcio Roberto Silva**, por me acompanhar desde a graduação e por me mostrar que ser humilde é uma das maiores virtudes do ser humano, pois "ninguém é tão grande que não possa aprender, nem tão pequeno que não possa ensinar".

Ao co-orientador **Prof. Dr. João Batista Ribeiro**, pela honra de ser sua aluna e por todas as palavras de conforto quando as coisas pareciam sem solução. Obrigada pela torcida de sempre.

Ao co-orientador **Prof. Dr. Humberto Moreira Húngaro**, pela preocupação com os resultados e pelas valiosas contribuições.

Aos membros da banca, **Dra. Liliane Denize Miranda Menezes** e **Prof. Dra. Vanessa Aglaê Martins Teodoro**, por aceitarem o convite e pelas correções e sugestões que foram essenciais para o enriquecimento deste trabalho.

Por fim, meu agradecimento à **Bianca**, que foi meu braço direito (e o esquerdo também) nessa jornada, a responsável por eu ter conseguido concluir mais essa etapa. Obrigada Bi, sem você essa conquista não teria sido possível. À **Paula**, por muitas vezes parar o seu próprio trabalho

para ajudar no meu, por ser tão companheira e amiga. E ao **Pedro**, que veio para somar, com a sua ajuda valiosa nos momentos de muito trabalho. Muito obrigada, minha equipe querida!

A todos que me ajudaram a chegar até aqui, minha eterna gratidão!

RESUMO

O Queijo Minas Artesanal (QMA) é um dos mais antigos e tradicionais queijos do Brasil e contribui para a geração de renda de diversos produtores rurais. Sua produção é caracterizada pela utilização de leite cru recém-ordenhado. Embora muito popular, o QMA nem sempre apresenta inocuidade suficiente, tornando-se necessário intensificar a demanda por estudos mais representativos sobre a segurança microbiológica deste produto. *Campylobacter* spp. tem sido o patógeno mais frequentemente associado a surtos de doenças de origem alimentar em todo o mundo nos últimos anos, entretanto, é um patógeno negligenciado em estudos de prevalência e nos critérios microbiológicos na legislação para queijos no Brasil. A detecção de *Campylobacter* spp. por métodos clássicos de identificação é de difícil execução e pode apresentar significativas variações nos resultados obtidos. Os métodos moleculares, em especial a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) são ferramentas promissoras para a rápida e direta detecção de *Campylobacter* spp. em alimentos, devido sua alta especificidade, sensibilidade e bom limite de detecção. O objetivo deste trabalho foi padronizar uma metodologia molecular baseada em PCR multiplex para identificação direta de *Campylobacter* spp. e diferenciação das espécies *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* em QMA do Serro. A PCR multiplex foi desenvolvida utilizando iniciadores *16S rRNA*, *hipO* e *ceuE*, específicos para a detecção de *Campylobacter* spp., *C. jejuni* e *C. coli*, respectivamente. Para a padronização da metodologia foram testadas 5 combinações variando-se as concentrações de $MgCl_2$ (1,0 μ L/2,0 μ L), tampão (2,5 μ L/3,5 μ L), DNA (10 μ L/5 μ L), agarose (1,0%/1,5%), além de modificações na voltagem (120V/80V) e temperatura de anelamento (66°C/62°C). A partir da padronização, realizou-se avaliação do limite de detecção (LD), utilizando as concentrações de 0,1, 10, 10^3 e 10^5 UFC/g. Testes com enzimas de restrição *XhoI*, *HhaI* e *HindIII* foram realizados para gerar evidência adicional sobre a seletividade do método. Também foi avaliada a presença de *Campylobacter* spp. em amostras de campo. A PCR multiplex padronizada mostrou ser um método rápido e efetivo na detecção de *Campylobacter* spp., *C. jejuni* e *C. coli* em amostras de QMA artificialmente contaminadas. O LD foi estimado em 10^3 UFC/mL. Os testes com as enzimas de restrição confirmaram a seletividades dos primers. Ao avaliar a presença deste patógeno em amostras de campo, houve inconsistência nos resultados utilizando a PCR multiplex. O método mostrou-se efetivo para a detecção de *Campylobacter* spp. no queijo artificialmente contaminado e inconsistente para a pesquisa deste patógeno em amostras de campo, o que pode ser explicado pelo LD. Como perspectiva futura, foi proposto implementar a etapa de enriquecimento seletivo das amostras para elevar a sensibilidade do método, bem como validação da metodologia para avaliar a especificidade da PCR.

Palavras-chave: *Campylobacter* spp.. PCR multiplex. Queijo Minas Artesanal. Serro.

ABSTRACT

The Artisanal Minas Cheese (AMC) is one of the oldest and most traditional cheeses in Brazil and it contributes to the income generation of several rural producers. The production of artisanal minas cheese is characterized using raw milk freshly milked. Although very popular, artisanal minas cheese does not always present sufficient innocuousness, requiring intensifying the demand for more representative studies about microbiological safety of this product. *Campylobacter* spp. has been the most frequently pathogen associated with outbreaks of foodborne diseases worldwide in recent years, however it is a neglected pathogen in prevalence studies and in the microbiological standards for cheeses in the Brazilian legislation. The detection of *Campylobacter* spp. by conventional methods of identification is difficult to perform and may present significant variations in the results. Molecular methods, especially Polymerase Chain Reaction (PCR) are promising tools for the rapid and direct detection of *Campylobacter* spp. in food, due to its high specificity, sensitivity and good detection limit. The aim of this work was to develop a molecular methodology based on multiplex PCR for direct identification of *Campylobacter* spp. and differentiation of the species *C. jejuni* and *C. coli* in AMC from Serro. Multiplex PCR was developed using the primers *16S rRNA*, *hipO* and *ceuE*, specific for the detection of *Campylobacter* spp., *C. jejuni* and *C. coli*, respectively. In order to develop the methodology, 5 reaction combinations were tested, with different concentrations of $MgCl_2$ (1,0 μ L/2,0 μ L), buffer (2,5 μ L/3,5 μ L), DNA(10 μ L/5 μ L), agarose gel (1,0%/1,5%), besides modifications in voltage of electrophoretic running (120V/80V) and annealing temperature (66°C/62°C). The detection limit (DL) was evaluated using the concentrations: 0,1, 10, 10³ and 10⁵ CFU/ml. Tests with restriction enzymes *XhoI*, *HhaI* and *HindIII* were performed to provide additional evidence about the selectivity of the method. The *Campylobacter* spp. presence in field samples was also evaluated. The multiplex PCR developed in this work has been shown to be a rapid and effective method for the detection of *Campylobacter* spp., *C. jejuni* and *C. coli* in artificially contaminated AMC samples. DL was estimated at 10³ CFU/mL. Tests with the restriction enzymes confirmed the selectivity of the primers. When evaluating the presence of this pathogen in field samples, there was inconsistency in the results using multiplex PCR. The method was effective for the detection of *Campylobacter* spp. in the artificially contaminated samples and inconsistent for field samples, which can be explained by DL. As a future perspective, it was proposed to implement the selective enrichment step of the samples to improve the sensitivity of the method, as well as validation of the methodology to evaluate the PCR specificity.

Keywords: *Campylobacter* spp.. Multiplex PCR. Artisanal minas cheese. Serro.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Fluxograma de produção de QMA	21
Quadro 1: Possíveis causas e soluções para problemas que podem acontecer no procedimento de extração de DNA	40
Figura 2: Microrregiões produtoras de Queijo Minas Artesanal.....	22
Quadro 2: Volume dos reagentes empregados no preparo do mix da PCR monoplex	47
Figura 3: Fontes de infecção por <i>Campylobacter</i> spp.....	31
Quadro 3: Ciclo de amplificação para cada gene testado no trabalho	48
Figura 4: Mapa de restrição para a sequência de 857 pb do gene <i>16S rRNA</i>	51
Figura 5: Mapa de restrição para a sequência de 735 pb do gene <i>hipO</i>	51
Figura 6: Mapa de restrição para a sequência de 462 pb do gene <i>ceuE</i>	52
Figura 7: Identificação do gênero <i>Campylobacter</i> spp. pelo primer <i>16S rRNA</i> por PCR monoplex	54
Figura 8: Identificação da espécie <i>C. jejuni</i> pelo primer <i>hipO</i> por PCR monoplex.....	55
Figura 9: Identificação da espécie <i>C. coli</i> pelo primer <i>ceuE</i> por PCR monoplex	55
Figura 10: Teste 1 da padronização da PCR multiplex para a detecção de <i>Campylobacter</i> spp. e diferenciação das espécies <i>C. jejuni</i> e <i>C. coli</i>	56
Figura 11: Teste 2 da padronização da PCR multiplex para a detecção de <i>Campylobacter</i> spp. e diferenciação das espécies <i>C. jejuni</i> e <i>C. coli</i>	57
Figura 12: Teste 3 da padronização da PCR multiplex para a detecção de <i>Campylobacter</i> spp. e diferenciação das espécies <i>C. jejuni</i> e <i>C. coli</i>	58
Figura 13: Teste 4 da padronização da PCR multiplex para a detecção de <i>Campylobacter</i> spp. e diferenciação das espécies <i>C. jejuni</i> e <i>C. coli</i>	59
Figura 14: Teste 5 da padronização da PCR multiplex para a detecção de <i>Campylobacter</i> spp. e diferenciação das espécies <i>C. jejuni</i> e <i>C. coli</i>	60
Figura 15: Avaliação do limite de detecção de PCR monoplex para detecção de <i>Campylobacter</i> spp. em amostras de queijo minas artesanal.....	61
Figura 16: Avaliação do limite de detecção de PCR monoplex para detecção de <i>Campylobacter</i> spp. em concentrado de células de amostras de queijo minas artesanal	62
Figura 17: Avaliação do limite de detecção de PCR multiplex padronizada para detecção de <i>Campylobacter</i> spp., <i>C. jejuni</i> e <i>C. coli</i> em amostras de queijo minas artesanal	63
Figura 18: Teste com as enzimas de restrição XhoI, HhaI e HindIII para os genes <i>16S rRNA</i> , <i>hipO</i> e <i>ceuE</i> , respectivamente	64

Figura 19: Avaliação da qualidade de DNA extraído de amostras de queijo minas artesanal pelo método orgânico de extração 65

Figura 20. PCR multiplex para a detecção de *Campylobacter* spp. e diferenciação das espécies *C. jejuni* e *C. coli* em amostras de queijo minas artesanal de campo.....66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Primers usados na amplificação de fragmentos de DNA específicos do gênero <i>Campylobacter</i> spp. e das espécies <i>C. jejuni</i> e <i>C. coli</i>	47
Tabela 2: Testes realizados para a padronização da PCR multiplex para identificação de <i>Campylobacter</i> spp., <i>C. jejuni</i> e <i>C. coli</i>	49
Tabela 3: Reagentes e condições da clivagem dos fragmentos de DNA com enzimas de restrição	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACMSF	Advisory Committee on the Microbiological Safety of Food
ALMG	Assembleia Legislativa de Minas Gerais
BAM	Bacteriological Analytical Manual
CCAMP	Coleção de <i>Campylobacter</i>
CCJ	Comissão de Constituição e Justiça
CIG	Coordenação de Incentivo à Indicação Geográfica
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos Tri-fosfatados
DO	Densidade Ótica
DOA	Doenças de Origem Alimentar
ELISA	Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay
EMATER	Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural de Minas Gerais
FDA	Food and Drug Administration
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
IG	Indicação Geográfica
IMA	Instituto Mineiro de Agropecuária
IN	Instrução Normativa
IPHAN	Instituto de Patrimônio Histórico Artístico Nacional
ISO	International Organization for Standardization
LAAA	Laboratório de Análise de Alimentos e Águas
LD	Limite de Detecção
LML	Laboratório de Microbiologia do Leite
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
NCBI	National Center for Biotechnolgy Information
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
QMA	Queijo Minas Artesanal
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RDP	Ribossomal Database Project
RIISPOA	Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal
SGB	Síndrome de Guillain-Barré
SDC	Secretaria de Desenvolvimento Agropecuário e Cooperativismo

UFC Unidade Formadora de Colônia
WHO World Health Organization

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	OBJETIVOS	20
2.1	OBJETIVO GERAL.....	20
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
3	REVISÃO DA LITERATURA	21
3.1	QUEIJO MINAS ARTESANAL.....	21
3.1.1	Patógenos mais prevalentes no Queijo Minas Artesanal	23
3.1.5	Legislação brasileira de Queijo Minas Artesanal	25
3.2	<i>Campylobacter</i> spp.....	27
3.2.1	Aspectos gerais sobre o microrganismo	27
3.2.2	Características e epidemiologia da campilobacteriose	29
3.2.3	Fontes de infecção e modo de transmissão	30
3.2.4	<i>Campylobacter</i> em lácteos.....	33
3.3	MÉTODOS ANALÍTICOS PARA IDENTIFICAÇÃO DE <i>Campylobacter</i> spp. EM LÁCTEOS	34
3.3.1	Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	36
3.3.1.1	Extração de DNA bacteriano: cuidados e dificuldades	38
3.3.1.2	Fatores que influenciam a PCR	41
4	MATERIAL E MÉTODOS	43
4.1	ESTIRPES BACTERIANAS: ATIVAÇÃO E MANUTENÇÃO.....	43
4.2.	CONTAMINAÇÃO ARTIFICIAL DO QUEIJO MINAS ARTESANAL.....	43
4.3	EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE DNA DE <i>Campylobacter</i> spp. EM CULTURAS PURAS	44
4.4	EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE DNA TOTAL EM QUEIJO MINAS ARTESANAL	45
4.5	REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE.....	46
4.5.1	Primers	46
4.5.2	PCR monoplex	47
4.5.3	Padronização da PCR multiplex	48
4.5.4	Análise da PCR em gel de agarose	49
4.5.5	Estimativa do limite de detecção das PCRs monoplex e multiplex	50
4.5.6	Análise de restrição dos amplicons	50

4.6	DETERMINAÇÃO DA PREVALÊNCIA DE <i>Campylobacter</i> spp. EM AMOSTRAS DE QUEIJO MINAS ARTESANAL	53
5	RESULTADOS	54
5.1	AVALIAÇÃO DOS PRIMERS PARA OS GENES <i>16S rRNA</i> , <i>hipO</i> E <i>ceuE</i> POR PCR MONOPLEX	54
5.2	PADRONIZAÇÃO DE PCR MULTIPLEX PARA DETECÇÃO DE <i>Campylobacter</i> spp., <i>Campylobacter jejuni</i> E <i>Campylobacter coli</i>	56
5.2.1	Limite de detecção das PCRs monoplex e multiplex	60
5.2.1	Análise de restrição dos amplicons	63
5.3	DETERMINAÇÃO DA PREVALÊNCIA DE <i>Campylobacter</i> spp. EM AMOSTRAS DE QUEIJO MINAS ARTESANAL	65
6	DISCUSSÃO	67
7	CONCLUSÃO	78
8	CONSIDERAÇÕES FINAIS	79
	REFERÊNCIAS	80

1. INTRODUÇÃO

O queijo Minas Artesanal (QMA) é um dos mais antigos e tradicionais queijos do país e contribuem para a geração de renda de diversos produtores rurais. Sua produção é caracterizada pela utilização de leite cru recém-ordenhado em propriedades rurais com base em agricultura familiar e submetidos à maturação (DORES, FERREIRA, 2012).

A baixa adoção de boas práticas agropecuárias e de fabricação e o uso de leite cru isento de tratamento térmico na produção de QMA caracterizam esse alimento como um potencial veiculador de microrganismos patogênicos, o que resulta em importante questão de saúde pública (BRANT, FONSECA, SILVA, 2007). Sendo assim, embora muito popular, o QMA nem sempre apresenta inocuidade suficiente, uma vez que aliado à falta de padronização da fabricação e o uso de leite cru, existe ainda uma deficiência de fiscalização na cadeia produtiva (FEITOSA et al., 2003; DORES, NOBREGA, FERREIRA, 2013). Dessa maneira, torna-se necessário intensificar os estudos mais representativos sobre a segurança microbiológica deste produto.

Uma variedade de estudos aponta os coliformes totais, termotolerantes e *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella spp.* e *Listeria monocytogenes* como os microrganismos mais comumente pesquisados e encontrados nos QMAs (ORNELAS, 2005; SOARES, 2014; CUNHA, 2016). Entretanto, existem outros patógenos que podem ser veiculados pelo QMA que são pouco contemplados nos estudos de prevalência e nos critérios microbiológicos na legislação para queijos no Brasil, tais como *Mycobacterium bovis*, *Brucella sp.*, *Campylobacter jejuni* e *Coxiella burnetii*.

Dentre estes microrganismos negligenciados, *Campylobacter* tem sido o patógeno mais frequentemente associado a surtos de doenças de origem alimentar (DOA) em todo o mundo nos últimos anos (KAAKOUSH et al., 2015). Esta bactéria é responsável pela doença infecciosa campilobacteriose, cujos principais sintomas são diarreia, cólicas, dores abdominais e febre dentro de dois a cinco dias após a exposição ao microrganismo. As

complicações pós-infecção podem incluir artrite reativa, caracterizada por inflamação dolorosa das articulações e também distúrbios neurológicos tardios como a síndrome de Guillain-Barré (WHO, 2016).

As principais fontes de infecção de *Campylobacter* para humanos são as aves, particularmente frangos. Entretanto, este patógeno também pode contaminar outros tipos de alimentos, como leite e derivados lácteos. Bianchinia et al. (2014) em pesquisa na Itália detectaram *Campylobacter jejuni* em 34 (12%) amostras de leite cru. Este patógeno também foi detectado em amostras de leite cru e queijos com prevalência de 24,6% no Egito (EL-ZAMKAN, HAMEED, 2016) e de maneira semelhante em fazendas dos EUA, nas quais o microrganismo estava presente em 24,9% das amostras de leite cru de tanques de expansão e em filtros de leite (DEL COLLO et al., 2017).

No Brasil existem poucos estudos relacionados à pesquisa de *Campylobacter* em leite e derivados lácteos. Na região metropolitana de São Paulo, Kobayashi et al. (2017) detectaram a presença de *Campylobacter* spp. em 18/38 (47,37%) amostras de queijos de produção informal. Contudo, observa-se que a presença deste patógeno é frequentemente associada ao consumo de leite cru (SILVA et al., 2003; CERVA et al., 2014; NARCIZO, MONTANHINI, 2014).

Considerando a natureza fastidiosa de *Campylobacter* e alguns aspectos limitantes, como complexidade dos meios de cultivo, agentes seletivos, condições específicas de incubação e situações de estresse, os métodos clássicos de identificação são de difícil execução e podem apresentar significativas variações nos resultados obtidos (DEBRUYNE et al., 2008; BRASIL, 2011). Além disso, a diferenciação de *C.jejuni* de outros microrganismos do mesmo gênero é baseada no teste da hidrólise do hipurato, o que nem sempre é preciso, uma vez que já existem relatos sobre cepas de *C. jejuni* com ausência da enzima hipuricase (BRASIL, 2011). Os métodos moleculares são ferramentas promissoras para a rápida e direta

detecção de *Campylobacter* em alimentos, devido a sua alta especificidade, sensibilidade e bom limite de detecção. Essas características os tornam uma eficiente alternativa aos métodos convencionais de diagnóstico (RUDI et al., 2004; DE BOER et al., 2015).

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é muito utilizada em combinação com métodos tradicionais, em substituição aos métodos bioquímicos clássicos de confirmação. O método de PCR pode ser aplicado para culturas puras ou diretamente em amostras biológicas contendo o microrganismo de interesse. Entretanto, alguns alimentos, como os queijos, são complexos em termos de composição química e microbiológica e, assim, podem apresentar inibidores da PCR associados à matriz alimentar, como já foi relatado por Schrader et al. (2012).

Diante da complexidade que a matriz queijo representa e da diversidade de QMA comercializados no Brasil, faz-se necessário constante aprimoramento de técnicas para a identificação de patógenos nesse alimento. Embora o método de PCR já seja bastante difundido para a detecção de *Campylobacter* em frangos e seus derivados cárneos e alguns estudos tenham sido publicados voltados para o uso de PCR em leite cru e derivados lácteos, até o momento não existem trabalhos relacionados à detecção de *Campylobacter* em QMA por esta técnica. Sendo assim, o presente estudo foi desenvolvido visando à amplificação das possibilidades de técnicas de detecção de *Campylobacter* em QMA, considerando as particularidades deste alimento, por meio da padronização de um método rápido, de baixo custo e eficiente baseado em PCR multiplex.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Padronizar uma metodologia molecular baseada em PCR multiplex para identificação de *Campylobacter* spp. em queijo Minas Artesanal do Serro.

2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

- Otimizar a extração de DNA a partir de amostras de queijo Minas Artesanal do Serro;
- Avaliar o limite de detecção do método molecular baseado em PCR na detecção de *Campylobacter* spp. em queijo Minas Artesanal do Serro;
- Avaliar a seletividade do método para a detecção de *Campylobacter* spp., *C. jejuni* e *C. coli* em amostras de queijo Minas Artesanal por meio da ação de enzimas de restrição;
- Determinar a presença de sequência de DNA espécie específico de *Campylobacter* spp. em amostras de queijo Minas Artesanal;
- Determinar a ocorrência de *Campylobacter* spp. em amostras de queijo Minas Artesanal provenientes do Serro, Canastra, Cerrado e Triângulo Mineiro.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 QUEIJO MINAS ARTESANAL

Os primeiros registros de fabricação de queijos no Brasil datam de 1581. Segundo o historiador inglês Robert Southey, fabricava-se manteiga e queijo de leite de vacas, ovelhas e cabras na Vila de São Salvador, Bahia de Todos os Santos. Por volta do século XVII, com o ciclo do ouro em Minas, desenvolveu-se e foi reconhecida como atividade econômica no estado de Minas Gerais e também em outros estados, como no Sul, a partir de 1752, e em menor escala no Norte do Brasil (DIAS, 2010).

O queijo minas artesanal (QMA) é um alimento produzido artesanalmente, de acordo com a tradição histórica e cultural da região produtora, a partir de leite cru recém-ordenhado (REZENDE et al., 2010). Além do leite cru, o coalho e o sal também compõem a produção do queijo, juntamente com o “pingo”. O pingo é um fermento endógeno comumente utilizado pelos produtores de QMA, composto por um grupo de bactérias lacto-fermentativas típicas de cada região, que confere ao queijo características sensoriais diferenciadas (FARIA, 2017). A Figura 1 representa o fluxograma de fabricação de QMA.

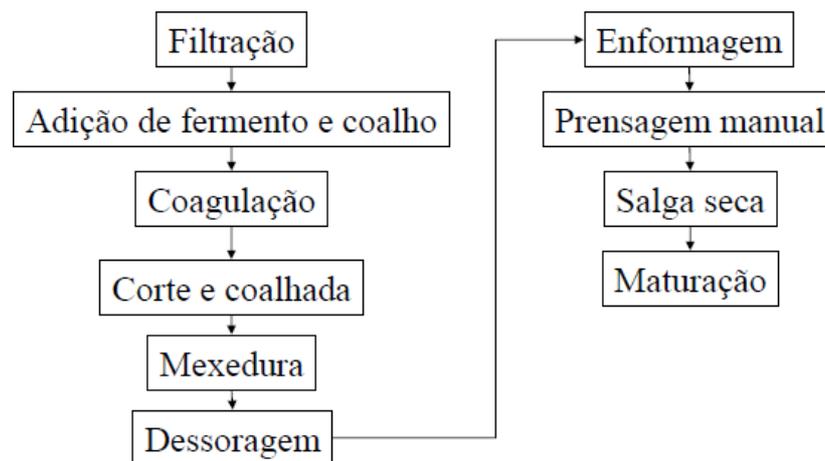


Figura 1: Fluxograma de produção de QMA

Fonte: Lei nº 20.549 de 18 de dezembro de 2012 (MINAS GERAIS, 2012)

Em Minas Gerais, a produção de QMA representa uma importante atividade para a economia e identidade sócio-cultural do estado e até o momento sete tradicionais regiões produtoras destes queijos são assistidas pela Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural de Minas Gerais (EMATER/MG) e cadastradas no Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA), sendo elas: Araxá, Campo das Vertentes, Canastra, Cerrado, Serra do Salitre, Serro e Triângulo Mineiro. As sete microrregiões englobam 75 municípios, sendo 270 queijarias regularizadas no IMA. A Figura 2 retrata o mapa das regiões produtoras de QMA.

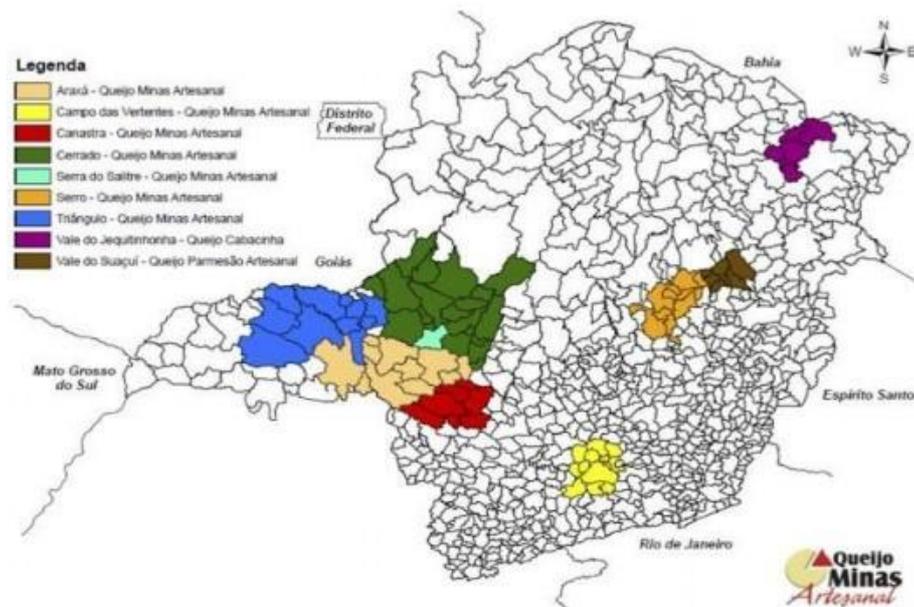


Figura 2: Microrregiões produtoras de Queijo Minas Artesanal (Adaptado de EMATER/MG, 2014)

O Serro e a Canastra são regiões historicamente reconhecidas como produtoras de QMA e apresentam certificação de Indicação Geográfica (IG), que garante a procedência e a qualidade do produto. Segundo a Coordenação de Incentivo à Indicação Geográfica de Produtos Agropecuários da Secretaria de Desenvolvimento Agropecuário e Cooperativismo (CIG/SDC) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), o registro de

IG é um “reconhecimento da notoriedade, reputação, valor intrínseco e identidade do produto, além de proteger seu nome geográfico e distingui-lo de similares disponíveis no mercado” (MAPA, 2015). Além disso, em 13 de junho de 2008, o Instituto de Patrimônio Histórico Artístico Nacional (IPHAN) reconheceu o modo artesanal de fazer queijo minas das regiões do Serro, Canastra e Serra do Salitre como patrimônio cultural imaterial do Brasil (LEAL, BORGES, 2012).

A indústria de queijo ocupa posição de destaque na economia global e os queijos artesanais produzidos a partir de leite cru são amplamente apreciados em todo mundo (MATA, 2009). Porém, a produção e comercialização de um produto seguro à saúde do consumidor ainda caracteriza-se como uma questão crítica para os produtores e órgãos competentes. Sendo assim, existe uma demanda em intensificar os estudos mais representativos sobre segurança do QMA no Brasil.

3.1.1 Patógenos mais prevalentes no Queijo Minas Artesanal

Como o QMA é fabricado a partir de leite cru, é um alimento potencialmente veiculador de microrganismos patogênicos. Em uma busca de trabalhos nacionais nas bases de dados Google Acadêmico, Scopus, Science Direct e Scielo utilizando as palavras-chave “microbiologia” e “queijos artesanais”, foi observado que os microrganismos mais comumente pesquisados nesses produtos são coliformes 30°C, coliformes 45°C, *Estafilococos* coagulase positiva, *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes*, microrganismos estes que são preconizados no Decreto estadual nº 42.645 de 05 de junho de 2002.

Almeida et al. (2012) em seu trabalho de caracterização da produção de QMA na região de Montes Claros (MG), obtiveram frequência de 51,7% de coliformes totais, 17,9% de coliformes termotolerantes e 28,6% de *Staphylococcus* coagulase positiva nas 28 amostras de QMA analisadas. Zaffari, Mello, Costa (2007) analisaram 80 amostras de queijos artesanais

comercializados em estradas do litoral norte do Rio Grande do Sul. Das 80 amostras, 16% continham *Listeria* spp., sendo 3,7% identificadas como *Listeria monocytogenes*. Esses autores observaram que as estações do ano influenciaram no isolamento de *Listeria* spp., sendo a primavera considerada a estação do ano em que houve maior número de isolados. Cunha (2016) avaliou 16 amostras de QMA do Triângulo Mineiro, provenientes de quatro queijarias, para os microrganismos *Staphylococcus* coagulase positivo, *Salmonella* spp. e *Listeria* spp. *Staphylococcus* coagulase positivo foi encontrado em três queijarias. O gênero *Salmonella* não foi isolado, ao passo que *Listeria* spp. foi isolada em 12,5% das amostras.

Entretanto, existem outros patógenos com importância médica, que podem ser veiculados pelo QMA, que são pouco abordados nos estudos de prevalência e nos critérios microbiológicos na legislação para queijos no Brasil. Exemplo desses patógenos são *Mycobacterium bovis*, *Brucella* spp., *Campylobacter* spp. e *Coxiella burnetii*.

Silva et al. (2013) ao estudarem 189 pacientes com tuberculose, encontraram três coinfeções de *M. bovis* com *M. tuberculosis* associadas ao consumo de queijos artesanais. Wood et al. (1992), em uma revisão de surtos ocorridos entre 1981 e 1990 nos Estados Unidos, observaram que 621 indivíduos foram afetados por *C. jejuni* após consumirem leite cru. Também no Brasil, um surto de infecção alimentar por *C. jejuni* associado ao consumo de leite cru acometeu estudantes que visitaram uma fazenda produtora de leite tipo A, sendo este alimento responsável por uma taxa de ataque de 57,6% entre os que o consumiram (SILVA et al., 2003; SILVA, 2007).

Duch (2015) estudando QMA da região do Serro encontrou 30,9% (17/55) amostras positivas para *Brucella* spp. utilizando análises de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

Angelakis e Raoult (2010) apontaram o leite cru como fonte de *Coxiella burnetii*, ressaltando que nem sempre a pasteurização irá eliminar esse microrganismo. Faria (2017) estudou a prevalência de *Coxiella burnetii* em QMAs da região do Serro e avaliou 53

amostras de queijo provenientes de propriedades cadastradas no IMA por PCR convencional para a detecção do gene IS1111 . Do total de amostras analisadas, cinco (9,43%) apresentaram DNA de *C. burnetti* confirmado por sequenciamento.

Estes trabalhos endossam a importância desses patógenos com relação ao QMA e a necessidade de serem incluídos em estudos de prevalência.

3.1.2 Legislação brasileira de Queijo Minas Artesanal

Em 29 de março de 1952, a câmara dos deputados do Brasil aprovou o Decreto federal nº 30.691, que instituiu o Novo Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA), determinando normas que visam preservar a inocuidade, a identidade, a qualidade e a integridade dos produtos e a saúde do consumidor. Este mesmo regulamento iniciou as diretrizes que regulamentam o uso de leite cru na produção de queijos artesanais e nomeou os tipos de queijo produzidos com essa matéria prima (BRASIL, 1952).

A Lei nº 14.185 de 31 de janeiro de 2002 foi a primeira lei estadual de Minas Gerais aprovada no Brasil, garantindo a produção e a comercialização do QMA. Esta legislação definia o QMA como o queijo confeccionado conforme a tradição histórica e cultural da região do Estado onde for produzida, a partir do leite integral de vaca fresco e cru, retirado e beneficiado na propriedade de origem, que apresente consistência firme, cor e sabor próprios, massa uniforme, isenta de corantes e conservantes, com ou sem olhaduras mecânicas (BRASIL, 2002). Este mesmo produto também foi definido pela Lei estadual nº 19.492, de 13 de janeiro de 2011 como o “queijo elaborado na propriedade de origem do leite, a partir do leite cru, hígido, integral e recém-ordenhado, utilizando-se na sua coagulação somente a quimosina de bezerro pura e no ato da prensagem somente o processo manual, e que o produto final apresente consistência firme, cor e sabor próprios, massa uniforme, isenta de corantes e conservantes, com ou sem olhaduras mecânicas, conforme a tradição histórica e cultural da região do Estado onde for produzido”.

Em 18 de dezembro de 2012 a Lei nº 20.549 do estado de Minas Gerais, comumente conhecida como a “Lei do Queijo” revogou a Lei nº 14.185/2002 e alterou o conceito de queijo minas artesanal para “o queijo que apresente consistência firme, cor e sabor próprios, massa uniforme, isenta de corantes e conservantes, com ou sem olhaduras mecânicas, confeccionado a partir do leite integral de vaca fresco e cru, retirado e beneficiado na propriedade de origem”.

Devido à importância econômica e social do queijo artesanal no Brasil, em 2011, sua produção e comercialização foram legalizadas por meio da Instrução Normativa nº 57 (BRASIL, 2011), substituída pela Instrução Normativa nº 30 de 7 de agosto de 2013, do MAPA (BRASIL, 2013). A IN 30 permite que os queijos artesanais tradicionalmente elaborados a partir de leite cru sejam maturados por um período inferior a sessenta dias, quando estudos técnico-científicos comprovarem que a redução do período de maturação não compromete a qualidade e a inocuidade do produto. Além disso, essa condição fica restrita a queijarias situadas em região de IG registrada ou tradicionalmente reconhecida e em propriedade certificada como livre de tuberculose e brucelose.

Em setembro de 2017, o Governo do Estado encaminhou para a Assembleia Legislativa de Minas Gerais (ALMG) o projeto de Lei nº 4.631, que visa substituir a Lei nº 20.549/2012. Além de alterar normas de funcionamento das queijarias e estabelecer novos parâmetros para a fiscalização, o projeto apresenta estratégias de incentivo, como bonificação pela qualificação técnica dos produtores de queijo. O projeto também contempla a regularização de outras variedades de queijo, novas tecnologias de produção e maturação e o uso de leite de outras espécies (ALMG, 2017). Este projeto de lei aguarda aprovação na Comissão de Constituição e Justiça (CCJ).

A mais recente ação do Governo Federal foi a aprovação da Lei federal nº 13.680, sancionada em 14 de junho de 2018. Trata-se de uma alteração da Lei nº 1.283 de 18 de

dezembro de 1950, que dispõe sobre a inspeção industrial e sanitária dos produtos de origem animal. Foi definido que a comercialização interestadual de produtos alimentícios produzidos de forma artesanal é permitida, desde que sejam submetidos à fiscalização de órgãos de saúde pública dos Estados e do Distrito Federal (BRASIL, 2018). Sendo assim, os QMA não serão mais fiscalizados pelo MAPA ou pelas Secretarias de Agricultura do Estado, como era feito pelo IMA. Esse cenário é preocupante, uma vez que a segurança de queijos artesanais, que é uma importante questão de saúde pública, corre o risco de ser ainda mais negligenciada. Isso porque, os produtos artesanais ficam desobrigados de controles até que a lei seja regulamentada, o que configura um retrocesso perante o nível elevado já existente no setor de Agricultura com relação aos regulamentos e competências técnicas.

3.2 *Campylobacter* spp.

3.2.1 Aspectos gerais sobre o microrganismo

O gênero *Campylobacter* foi primeiramente descrito por Theodor Escherich em 1886, que identificou uma bactéria com forma helicoidal, isolada de fezes diarreicas de neonatos que apresentavam uma doença entérica chamada “cholera infantum” (BRASIL, 2011). Atualmente, *Campylobacter* spp. constituem um grande e diverso grupo de bactérias que compreende 27 espécies, nove subespécies e três biovars. Na classificação taxonômica, o gênero *Campylobacter* pertence à família *Campylobacteriaceae*, à ordem *Campylobacterales*, à classe *Epsilonproteobacteria* e ao filo *Proteobacteria* (BEISELE et al., 2011; GOLDMAN et al., 2011)..

Campylobacter spp. são bactérias gram-negativas e microaerofílicas, sendo esta última característica uma das mais marcantes do gênero. Estes microrganismos requerem baixa tensão de oxigênio para sua multiplicação. O desenvolvimento é inibido quando a concentração de O₂ é menor que 3% e maior que 15%. A atmosfera ideal para seu

crescimento contém aproximadamente 10% CO₂, 5% O₂ e 85% N₂ (MAN, 2011; BRASIL, 2011).

Diferindo da maioria dos patógenos que desencadeiam doenças de origem alimentar, *Campylobacter* spp. não são altamente adaptativos. Além de serem muito sensíveis ao estresse ambiental, são bactérias fastidiosas, que apresentam exigências especiais de condições de cultivo. Crescem na faixa de pH entre 5,5 - 8,0, com valor ótimo próximo do neutro e apresentam sensibilidade ao sal (MAN, 2011; BRASIL, 2011; SILVA et al., 2017).

Podem se apresentar nas formas de espirais, curvas ou bastonete. São móveis por um único flagelo polar, responsável pelo seu movimento característico em forma de “saca-rolha” ou “vai e vem” (MAN, 2011; BRASIL, 2011). Em culturas mais antigas ou sob condições de estresse, as células de *Campylobacter* spp. podem adquirir formas esféricas ou cocóides. A transição da morfologia celular vibrióide para a forma cocóide não leva à perda de seu poder infectante, entretanto, não são detectáveis por metodologias convencionais. Isso significa que o microrganismo está na forma viável, porém não cultivável (NACHAMKIN, 2007).

Nas últimas décadas, o reconhecimento de certas espécies do gênero *Campylobacter* spp. como patógenos humanos tem fortalecido a importância deste gênero tanto na medicina veterinária como também na medicina humana (BRASIL, 2011). Dentro do gênero *Campylobacter* spp., as espécies mais frequentemente relatadas em doenças humanas são *C. jejuni* e *C. coli*. Outras espécies como *C. lari* e *C. upsaliensis* também são isoladas de pacientes com doença diarreica, mas são relatadas com menor frequência (WHO, 2016). Essas espécies fazem parte do grupo de bactérias denominadas termofílicas e são microrganismos que se multiplicam em temperaturas entre 30 a 45° C, com temperatura ótima de 42° C, enquanto a morte celular ocorre entre 56 e 57° C. Entretanto, apesar de sua natureza termofílica, a temperatura do corpo humano parece ser propícia para o desenvolvimento e

quimiotaxia de *Campylobacter* (FERMÉR e ENGVALL, 1999; PARK, 2002; NGUYEN et al., 2006 e KHANNA et al., 2006),

Algumas espécies termofílicas como *C. jejuni*, *C. coli* e *C. fetus* subsp. *fetus* têm sido consideradas importantes responsáveis por zoonoses, as quais são base para estudos nas áreas de taxonomia, epidemiologia, biologia molecular e patogenicidade, na tentativa de elucidar mecanismos patogênicos desses microrganismos, especialmente quanto aos fatores de virulência. Sintomatologias clínicas variadas indicam a existência de diferentes mecanismos de virulência entre as cepas de distintas regiões geográficas. *C. jejuni* é considerado o mais virulento deste grupo, devido a sua resistência à fagocitose, seguido por *C. coli* (BRASIL, 2011).

3.2.2 Características e epidemiologia da campilobacteriose

O impacto das doenças de origem alimentar, incluindo campilobacteriose, é significativo: ano após ano cerca de uma em cada 10 pessoas adoecem. Essas doenças podem ser graves, especialmente para crianças. As doenças diarreicas são as doenças mais comuns resultantes de alimentos inseguros. Quinhentos e cinquenta milhões de pessoas adoecem anualmente, sendo 220 milhões crianças com menos de 5 anos. O gênero *Campylobacter* spp. é uma das 4 principais causas globais de doenças diarreicas (WHO, 2016).

A campilobacteriose é uma doença infecciosa causada por bactérias do gênero *Campylobacter* spp. O período de incubação é de 1 a 7 dias, sendo que no geral os primeiros sintomas surgem de 3 a 5 dias após a infecção (SILVA, et al, 2007).

Os sintomas apresentados pela maioria das pessoas doentes são diarreia, cólicas, dores abdominais e febre. A diarreia pode ser sanguinolenta e acompanhada de náuseas e vômitos. A doença tipicamente perdura cerca de uma semana. Algumas pessoas infectadas não apresentam quaisquer sintomas. Em pessoas com sistemas imunológicos comprometidos,

a bactéria ocasionalmente se espalha pela corrente sanguínea e provoca uma grave infecção que pode ser fatal (CDC, 2014).

As complicações pós-infecção podem incluir artrite reativa, caracterizada por uma inflamação dolorosa das articulações que pode durar vários meses e distúrbios neurológicos como a síndrome de Guillain-Barré (SGB) (WHO, 2016).

A SGB é uma doença autoimune, relacionada a uma resposta imunológica que o organismo desencadeia, estimulada por agentes infecciosos como *C. jejuni*. O agente infeccioso apresenta moléculas que são reconhecidas pelo sistema imunológico como antígenos “self” ou do próprio corpo. O organismo passa a produzir uma resposta imune específica contra esses antígenos próprios, que pode afetar nervos periféricos e raízes espinhais (BENETI, SILVA, 2006). O resultado é uma forma de paralisia grave, que pode resultar em disfunção neurológica e respiratória (WHO, 2016). A SGB apesar de ser uma patologia importante, de incidência crescente, ainda é deficitária do ponto de vista etiológico de diagnóstico, tratamento e prevenção (BENETI, SILVA, 2006).

3.2.3 Fontes de infecção e modo de transmissão

Os mamíferos e aves domésticos e selvagens são os principais reservatórios de *Campylobacter* spp. O patógeno coloniza o trato gastrointestinal dos animais em grande número e é transmitido entre os animais por meio da via fecal-oral (ACHA, SZYFRES, 2001).

Campylobacter spp. é encontrado regularmente em águas naturais, onde pode sobreviver durante várias semanas a baixas temperaturas. É interessante notar que a presença de *Campylobacter* spp. está geralmente atrelada à presença de coliformes totais, o que evidencia a contaminação fecal proveniente de aves e mamíferos e, em algumas circunstâncias, do próprio homem (ACHA, SZYFRES, 2001).

O microrganismo pode infectar os seres humanos diretamente por meio da água potável ou do consumo de produtos animais contaminados, tais como leite cru ou carne, em especial carne vermelha e frango (YOUNG, DAVIS, DIRITA, 2007). A Figura 3 retrata as fontes de contaminação por *Campylobacter* spp.

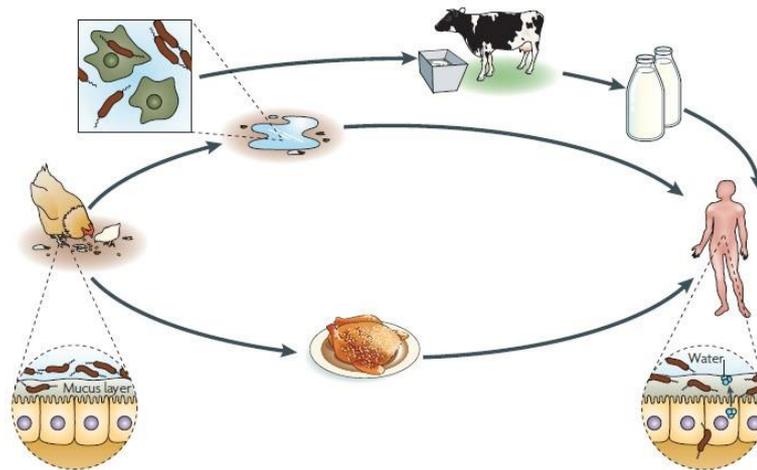


Figura 3: Fontes de infecção por *Campylobacter* spp. (YOUNG, DAVIS, DIRITA, 2007)

Carnes contaminadas podem ser resultado de más condições de higiene ao longo da cadeia de produção, especialmente devido à ausência ou ineficácia de boas práticas no momento do abate. Equipamentos e roupas utilizadas nos abatedouros ou matadouros também são fontes potenciais de contaminação da carcaça de animais durante o abate. Além disso, a contaminação cruzada posterior durante a manipulação da carne em fábricas, no varejo ou na cozinha do consumidor final pode contaminar outros alimentos que não requeram cozimento ou que foram cozidos insuficientemente (ACHA, SZYFRES, 2001; LAKE et al., 2007).

Calciati et al. (2012) mostraram um surto por *Campylobacter* em uma escola de Barcelona envolvendo carne de frango. Entre os 435 alunos potencialmente expostos, 75 desenvolveram a doença. Quarenta e cinco alunos acometidos forneceram amostras de fezes, em que 29 (64,4%) foram positivas para *C. jejuni*. Segundo os autores, tanto a carne

malcozida como contaminação cruzada de frango cru para outros alimentos preparados podem ter sido as causas do surto.

Nos Estados Unidos, de 2007 a 2012, a média de surtos associados ao leite não pasteurizado foi de 13,5 surtos por ano, mostrando que os surtos associados ao leite cru continuam a representar um grande desafio para a saúde pública (MUNGAI, BEHRAVESH, GOULD, 2015).

No Canadá, a doença campilobacteriose é comumente associada com água contaminada. Uma revisão dos surtos de origem hídrica ocorridos entre 1974 e 2001 neste país indicou que entre 150 surtos com um único agente causador identificado, 24% foram causados por *Campylobacter* (SCHUSTER et al., 2005).

No Brasil 21 estudos analisaram carcaças de frango para *Campylobacter* spp. Esses estudos foram conduzidos em três diferentes regiões do país e analisaram um total de 2116 carcaças coletadas de diferentes etapas do processo de abate de aves e também no varejo. Do total de amostras analisadas por métodos de análise variados, 834 (39,4%) foram positivos para *Campylobacter* spp. (SILVA, et al, 2017).

O controle dos alimentos e da água deve ser realizado em todas as etapas da cadeia produtiva, bem como na distribuição e no armazenamento. Além disso, também são importantes informações adicionais para o preparo adequado e o consumo final do alimento pelo consumidor, de maneira a diminuir a multiplicação do patógeno e, conseqüentemente, minimizar a ocorrência de surtos (BRASIL, 2011).

3.2.4 *Campylobacter* em lácteos

O leite apresenta propriedades que auxiliam a sobrevivência de *Campylobacter* spp. neste alimento, tais como a crioproteção. Em 1913 já era conhecido o uso do leite como aditivo para proteger as bactérias contra a morte celular após repetidos ciclos de congelamento e descongelamento (CODY et al., 2008). O mecanismo de ação dos crioprotetores se dá pela modificação da orientação da molécula de água nos cristais de gelo, por meio das ligações de hidrogênio que eles promovem com as moléculas de água, o que resulta em um ambiente menos prejudicial às células (ZHAO, ZHANG, 2005).

O efeito protetor do leite mantém ou auxilia a viabilidade de *Campylobacter* spp. por meio da alteração na fluidez da membrana da célula e pela contribuição do cálcio na estabilidade das enzimas celulares (BARACH et al., 1976; ANNOUS et al., 1999; CARVALHO et al., 2004). Além disso, a gordura do leite confere ao *Campylobacter* spp. maior resistência ao tratamento térmico, complementando, assim, a estabilidade celular do patógeno no leite (MONTEIRO, 2013). Ademais, o leite é altamente nutritivo e é considerado um meio ideal para o crescimento de *Campylobacter* spp., devido aos altos níveis de proteínas e carboidratos (CARVALHO et al., 2004).

O leite cru é um dos principais alimentos indicados como fonte de infecção em surtos por *Campylobacter*. Wood et al. (1992), em uma revisão de surtos ocorridos em humanos entre 1981 e 1990 nos Estados Unidos, ao avaliarem 1013 pessoas que foram acometidas, observaram que 621 indivíduos (61%) foram infectados por *Campylobacter jejuni* após consumirem leite cru. Já Modi et al. (2015) em seu estudo na Índia detectaram a presença de *Campylobacter* spp. 7 (2.91%) amostras de leite cru.

No Brasil, Narcizo e Montanhini (2014) avaliaram 15 amostras de leite cru e 15 amostras de leite pasteurizado quanto à presença de *Campylobacter jejuni* no Paraná. Em nenhuma das amostras de leite pasteurizado foi constatada a presença de *C. jejuni*, ao passo

que o patógeno foi detectado em 26,7% (4/15) das amostras de leite cru. Recentemente, Kobayashi et al. (2017) detectaram *Campylobacter* spp. em 6,66% de amostras de leite cru na região metropolitana de São Paulo.

Entretanto, *Campylobacter* spp. também podem estar presentes em outros derivados lácteos. Hussain et al. (2007) avaliaram 26 amostras de queijo provenientes de três cidades do Paquistão. Obteve-se positividade para *Campylobacter* spp. em 11,5% das amostras. Kobayashi et al. (2017) encontraram uma taxa maior comparado ao trabalho anterior. Os autores detectaram a presença de *Campylobacter* spp. em 18/38 (47,37%) amostras de queijos de produção informal na região metropolitana de São Paulo.

A mastite associada à *Campylobacter* spp. pode ser uma das causas da presença do patógeno no início da cadeia produtiva, porém, a causa mais comum de contaminação do leite é o contato com fezes durante a ordenha dos animais, em função de condições insatisfatórias de higiene (SILVA et al., 2007). O setor de Estratégias em Doenças Transmitidas por Alimentos da *Food Standards Agency* de Londres destacou a contribuição que o setor de leite e derivados pode dar ao controle de diversos patógenos, incluindo *Campylobacter*. O aprimoramento das boas práticas de ordenha e de fabricação nos setores de laticínios é visto como meio útil de prevenir a contaminação cruzada e os surtos de campilobacteriose (ACMSF, 2004).

3.3 MÉTODOS ANALÍTICOS PARA IDENTIFICAÇÃO DE *CAMPYLOBACTER* EM LÁCTEOS

O monitoramento de *Campylobacter* na cadeia de lácteos auxilia na identificação de fontes primárias de contaminação, no estabelecimento de medidas preventivas e na avaliação do risco microbiológico do consumo destes alimentos. Vários métodos analíticos foram desenvolvidos e avaliados para o isolamento e enumeração de *Campylobacter* em amostras de

leite e derivados. Contudo, não há consenso sobre a metodologia ideal, uma vez que todas apresentam vantagens e desvantagens (SILVA et al., 2018).

Como *Campylobacter* spp. são organismos fastidiosos e requerem um ambiente microaerofílico para crescerem, a maioria dos procedimentos laboratoriais é otimizada para isolar as espécies mais comuns: *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* (HUQ et al., 2014). De acordo com as características de cada método analítico para *Campylobacter* spp., estes podem ser divididos em métodos de cultivo convencionais, métodos moleculares e métodos imunológicos (SILVA et al., 2018).

Os métodos convencionais são baseados no desenvolvimento de microrganismos em meios de cultura apropriados e confirmação de colônias típicas por morfologia, testes bioquímicos e PCR. O Manual Analítico Bacteriológico (BAM), Capítulo 7, publicado pela Food and Drug Administration (FDA) descreve um método aplicado para o isolamento de espécies de *Campylobacter* spp. em alimentos e água e é a única metodologia a apresentar um protocolo específico para queijos. O método utiliza 50 g de amostra de queijo, inicia com o pré-enriquecimento no Caldo Bolton a 35 °C por 4 horas e, em seguida, enriquecimento a 42 °C, de 20 a 44 horas, ambas as etapas incubadas sob condições microaeróbicas (85% de N₂, 10% de CO₂ e 5% O₂). Após o período de incubação, alíquotas do cultivo são estriadas em placas contendo o meio Charcoal Cefoperazone Deoxycholate Modified (mCCDA) e o meio cromogênico CampyFood (Biomérieux®) e incubadas a 42 °C por 24 a 48 horas sob condições de microaerofilia. As colônias típicas são submetidas à análise de morfologia celular (coloração de Gram) e confirmadas por PCR e provas bioquímicas, como o teste de hidrólise do hipurato. Além do BAM/FDA, os métodos convencionais de cultivo para detecção de *Campylobacter* spp. também são preconizados pela International Organization for Standardization (ISO 10272-1 e 10272-2), pelo Guia do Laboratório de Microbiologia do

Departamento de Agricultura dos Estados Unidos e pelo método FNES15 (F21) do Departamento de Saúde Pública da Inglaterra (SILVA et al., 2018).

Métodos imunológicos baseados na reação antígeno-anticorpo também tem sido amplamente utilizados na detecção de *Campylobacter* (OYARZABAL, BATTIE, 2012). O mais simples é o teste de aglutinação do látex, que é aplicado por aproximadamente 20 anos na identificação rápida de culturas desse microrganismo. O princípio deste teste é o uso de anticorpos policlonais cobrindo partículas de látex, que reagem contra proteínas de membrana externa ou flagelar de várias espécies de *Campylobacter*, como *C. jejuni*, *C. coli* e *C. lari* (GHARST et al., 2013). O teste de ELISA (do inglês “Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay”) é o imunoenensaio mais popularmente usado para a detecção de patógenos em leite e derivados. Eles são tipicamente projetados como um ensaio “sanduíche”, no qual um anticorpo ligado a uma matriz sólida é utilizado para capturar a bactéria e um segundo anticorpo conjugado a uma enzima então liga-se a esta bactéria alvo (OYARZABAL, BATTIE, 2012).

Os métodos moleculares, especialmente a PCR, são ferramentas promissoras para a detecção rápida e direta de *Campylobacter* spp. em alimentos, devido à especificidade e à sensibilidade dos métodos (DE BOER et al., 2015; RUDI et al., 2004). Eles são particularmente vantajosos para a detecção de células não cultiváveis ou aqueles microrganismos que não crescem facilmente usando métodos tradicionais de cultivo (HUQ et al., 2014) e serão mais detalhados no próximo tópico.

3.3.1 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A técnica de PCR e suas variações visam a amplificação e detecção de pequenos fragmentos alvo do genoma por procedimentos específicos. A PCR monoplex tem sido utilizada em combinação com métodos tradicionais, na substituição aos métodos bioquímicos

clássicos de confirmação. Esta técnica pode ser usada para confirmar o gênero e distinguir espécies de *Campylobacter* usando primers específicos para genes alvo, incluindo *16S rRNA*, *hipO*, *mapA*, *asp* e *ceuE* (ABUBAKAR et al., 2007; EL-ADAWY et al., 2012).

A PCR multiplex (m-PCR) possibilita confirmar o gênero e detectar a espécie simultaneamente, por meio da combinação de diversos primers específicos para genes alvo (HUQ, GONIS, ISTIVAN, 2014). Por este método, dois ou mais fragmentos de DNA são amplificados na mesma reação (HENEGARIU et al., 1997). Essas metodologias, PCR monoplex e multiplex, podem ser aplicadas em diagnóstico de rotina para detecção de *Campylobacter* em alimentos e amostras clínicas. Entretanto, eles não são capazes de quantificar esse patógeno na amostra. Esta proposta pode ser obtida utilizando métodos de PCR em tempo real (qPCR), que pode ser uma alternativa para a detecção e quantificação de *Campylobacter* em diferentes tipos de amostras (DE BOER et al., 2015).

A principal limitação nos métodos de PCR convencionais é que eles são incapazes de distinguir entre DNA de células viáveis e DNA de células mortas (RUDI et al., 2005). De maneira a contornar essa restrição, corantes intercalantes como a monoazida de etídio (EMA) e a monoazida de propídio (PMA) podem ser utilizados em combinação com métodos de PCR em tempo real (qPCR) em diagnósticos em que se tem o interesse de diferenciar células viáveis das não viáveis. Estes corantes penetram em bactérias com membranas celulares danificadas e inibem a amplificação de DNA de células mortas (SEINIGE et al., 2014). A discriminação entre células viáveis e não viáveis é uma questão importante na investigação biológica (RUDI et al., 2005) e poderia ser uma importante estratégia para avaliar a viabilidade deste patógeno ao longo da maturação de QMA.

3.3.1.1 Extração de DNA bacteriano: cuidados e dificuldades

A extração de DNA é a primeira etapa na utilização de técnicas moleculares. Este processo é parte fundamental para se obter alta eficiência de amplificação nos protocolos que usam a PCR. A extração consiste na separação de proteínas, membranas e outros materiais celulares contidos na célula da qual o DNA é recuperado (ELKINS, 2013).

A extração de DNA bacteriano geralmente segue três passos: a lise da célula e liberação do material genético; a separação do DNA de outros componentes celulares que consiste na purificação deste DNA extraído. O método ideal é dependente da amostra e Elkins (2013) exemplifica três procedimentos de extração comumente usados para extração de DNA: o método orgânico, com o uso do fenol/clorofórmio para o processo de desproteinização; método inorgânico ou de sílica, processo simples e barato de extração no qual o rompimento da membrana se dá pela ligação do íon Mg^{2+} presente na célula com esferas de resina (Chelex 100[®]), acompanhado de fervura e o método de extração em fase sólida, processo simples de extração em que o DNA se liga a esferas paramagnéticas ou de sílica.

A extração orgânica é a mais utilizada. Esse método inicia-se com a lise celular e separação do DNA da célula por meio da adição de dodecil sulfato de sódio (SDS) e aplicação branda de calor (60° C). A proteinase K também deve ser adicionada para digerir as proteínas. No segundo passo da extração, o DNA é separado dos outros componentes celulares utilizando o reagente fenol-clorofórmio. Nesta etapa surgem duas fases e a porção contendo DNA é removida por pipetagem da camada superior. No terceiro passo, é realizada a precipitação e concentração do DNA com álcool, seguida por eluição com água ultrapura (BARATTO, MEGIOLARO, 2012; ELKINS, 2013). A maior dificuldade deste método para a extração de DNA bacteriano está na interferência pelo excessivo DNA da matriz, que é extraído juntamente com o DNA alvo. Além disso, este método requer múltiplas trocas de tubo, o que aumenta a possibilidade de erro por contaminação (ELKINS, 2013).

Rosa (2008) desenvolveu um método rápido para extração de DNA de bactérias, que não requer o uso de enzimas, como lisozima e proteinase K. Neste método é utilizado o carbonato de silício como agente físico para efetuar o rompimento da parede celular da bactéria. O DNA bacteriano foi extraído em menor tempo e de forma simples e econômica, quando comparado aos métodos convencionais.

Outra metodologia simples e rápida utilizada para culturas puras ou quando não há exigências quanto à quantidade e qualidade do DNA, é a extração térmica por fervura, em que a solução contendo as células bacterianas é submetida a choques térmicos para a lise celular e liberação do material genético (SAMBROOK et al., 1989). De acordo com o Manual Técnico de Diagnóstico Laboratorial de *Campylobacter* do Ministério da Saúde, o procedimento de fervura é o método oficial para a extração de DNA deste patógeno, aplicada à suspensão bacteriana obtida a partir da raspagem de colônias crescidas em ágar sangue (BRASIL, 2011). A extração de DNA do queijo configura um grande desafio, pois trata-se de uma amostra com várias limitações, como alto teor de gordura, alto grau de degradação do DNA e grande concentração de impurezas.

A extração pode ser uma das partes mais trabalhosas da análise de DNA. Os tubos devem ser cuidadosamente rotulados, especialmente quando as transferências de um tubo para outro são necessárias e todo o processo de extração requer um manuseio cuidadoso do material biológico para evitar a contaminação da amostra. O Quadro 1 exemplifica alguns problemas que podem surgir durante a extração de DNA, com as possíveis causas e sugestão de soluções.

Quadro 1. Possíveis causas e soluções para problemas que podem acontecer no procedimento de extração de DNA

Problemas	Possíveis causas	Possíveis soluções
Pouco <i>pellet</i> após a precipitação com álcool e centrifugação	Ausência de células suficientes em suspensão	Repetir a amostragem ou cultivo
	Amostra não foi centrifugada na velocidade suficiente	Centrifugar a amostra novamente na velocidade máxima da centrífuga
Baixa qualidade do DNA extraído ou DNA aparentando estar degradado	A amostra inicial não foi armazenada corretamente.	As nucleases podem ter degradado o DNA. Seguir as recomendações para armazenamento e manuseio da amostra.
	O DNA purificado não foi armazenado adequadamente.	
Baixo rendimento do DNA na quantificação	Se o rendimento for baixo e a pureza/qualidade for boa: a amostragem inicial foi insuficiente.	Repetir a amostragem
	Se o rendimento e a pureza/qualidade forem baixos: A amostra inicial não foi armazenada corretamente.	As nucleases podem ter degradado o DNA. Seguir as recomendações para armazenamento e manuseio da amostra.
	As células não foram completamente lisadas.	Homogeneizar bem a amostra e conferir a temperatura do banho na etapa inicial.
	Proteinase K inativa devido ao longo tempo de armazenamento após o preparo.	Preparar proteinase pelo menos 1 hora antes do uso.
DNA extraído com aspecto muito turvo	Restos celulares transferidos para tubo.	Centrifugar a amostra novamente e transferir o sobrenadante para um novo tubo. Evitar as sujidades.
Baixo desempenho do DNA na aplicação	Baixa qualidade do DNA	Degradação. Seguir as recomendações para armazenamento e manuseio da amostra.
	Se a qualidade do DNA for boa: contaminantes (lipídios, sais, etc.) podem estar presentes na amostra.	Não sobrecarregar a etapa de purificação, seguir com poucas amostras por vez. Respeitar a proporção de 1/3 do volume de sal adicionado no momento da precipitação do DNA
	Residual de etanol permanece na amostra	Certificar que a amostra está completamente seca antes da eluição.

Fonte: Adaptado de GE HEALTHCARE (2007)

3.3.1.2 Fatores que influenciam a PCR

Segundo Henegariu et al. (1997), o papel dos reagentes que compõem a PCR já vem sendo discutido e é possível observar estudos que apresentam uma discussão sobre os fatores que podem influenciar a amplificação e os resultados da PCR, tais como concentração de primers, perfil de ciclo, entre outros.

O passo decisivo para a expansão da PCR foi a descoberta da enzima *Taq* polimerase, extraída da bactéria *Thermus aquaticus*. Esta enzima é a mais adequada para utilização em metodologias como a PCR, por suportar altas temperaturas aplicadas na desnaturação do DNA molde (KASVI, 2015). Henegariu et al. (1997) testaram em seu trabalho a *Taq* polimerase de diferentes fornecedores em diferentes concentrações. Observou-se que o uso de grande quantidade de enzima, possivelmente devido à alta concentração de glicerol na solução estoque, resultou em uma amplificação despadronizada de várias amostras, ao passo que as diferentes fontes não influenciaram o funcionamento da *Taq* polimerase.

Para funcionar adequadamente, a enzima *Taq* polimerase requer magnésio livre na reação. O cloreto de magnésio ($MgCl_2$) atua na PCR como co-fator da enzima e, assim, o aumento da concentração de magnésio na reação muitas vezes tem efeitos positivos (HENEGARIU et al, 1997). Entretanto, altas concentrações são responsáveis pelo aparecimento de produtos inespecíficos, formados por aumento excessivo da atividade da polimerase e pela formação de dímeros de primers, por alterar o anelamento dos primers (VIEIRA, 2002).

A escolha ou o desenvolvimento de primers apropriados é essencial para o sucesso do resultado de um experimento de PCR (LORENZ, 2012). Henegariu et al (1997) mostraram que primers mais longos permitem que a reação aconteça em temperatura de anelamento mais alta, resultando em baixo rendimento de produtos inespecíficos. Existem alguns problemas comuns que surgem quando se projetam primers: 1. Auto-anelamento, resultando na formação

de uma estrutura secundária conhecida como “hairpin loop”; 2. Anelamento dos primers entre si ao invés de anelarem com o DNA molde, criando dímeros de primers; 3. Temperaturas de fusão (T_m) drasticamente diferentes para cada primer, dificultando a seleção de uma temperatura de anelamento que permitirá que ambos os primers se liguem eficientemente à sua sequência alvo durante os ciclos de amplificação (LORENZ, 2012).

Os desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dNTP's) são nucleotídeos usados como matéria prima na extensão das novas cadeias de DNA formadas durante a PCR. Os dNTP's são sensíveis aos ciclos de descongelamento/congelamento e para evitar problemas ao funcionamento da PCR, as soluções estoques são armazenadas em alíquotas pequenas para evitar que a mesma solução seja reutilizada muitas vezes. Sabe-se que a baixa concentração de dNTP's não impossibilita a amplificação do DNA, mas a quantidade de produto é visivelmente menor (HENEGARIU et al.,1997). Já altas concentrações de dNTP's podem afetar a especificidade dos primers, por meio do pareamento com eles (VIEIRA, 2002).

Por fim, os tampões de reação possuem uma diversidade de componentes, cujo efeito não pode ser subestimado. Normalmente, os tampões possuem pH entre 8,3 e 8,8 a 20°C e são compostos por tris (tris-hidroximetil-aminometano) e NaCl e/ou KCl (VIEIRA, 2002). Por exemplo, o tampão do kit de reagentes de PCR da Ludwig (Rio Grande do Sul, Brasil) é composto por 100 mM de Tris-HCl, pH 8,5 e 500 mM KCl, na concentração 10X. É importante observar as concentrações de íons, que podem influenciar tanto no anelamento dos primers, como na atividade da polimerase (VIEIRA, 2002).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ESTIRPES BACTERIANAS: ATIVAÇÃO E MANUTENÇÃO

As estirpes bacterianas de *Campylobacter jejuni* (CCAMP 492) e *Campylobacter coli* (CCAMP 1004) foram utilizadas neste estudo para controle positivo dos métodos, tanto na forma de cultura pura como adicionadas ao queijos. As bactérias foram cedidas pela Coleção de *Campylobacter* (CCAMP) do Laboratório de Zoonoses Bacterianas do Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) e mantidas no Laboratório de Análise de Alimentos e Águas, localizado na Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora (LAAA).

As culturas foram enviadas pela CCAMP em meio específico de criopreservação das cepas, contendo neo-peptona, glicerol e cloreto de sódio. As bactérias foram ativadas por enriquecimento seletivo em agar Brucella adicionado de suplemento. Para 100 mL de água destilada, foi pesado 4,4 g de caldo Brucella, 0,4 g de carvão ativo e 1,2 g de agar bacteriológico. O suplemento foi preparado com 0,5% de sulfato ferroso, 0,5% bissulfito de sódio e 0,5% piruvato de sódio. As estirpes foram estriadas no meio e incubadas a 42° C por 48 horas, em atmosfera de microaerofilia (FIOCRUZ).

Para manutenção das bactérias, após o período de incubação, as colônias foram transferidas em alçadas para tubos contendo meio semi sólido composto por caldo Brucella (2,8%), agar bacteriológico (0,3%) e vermelho neutro (1%). As bactérias ficaram ativas nesta condição por 15 dias, a 35 – 37° C, quando este ciclo foi repetido.

4.2 CONTAMINAÇÃO ARTIFICIAL DO QUEIJO MINAS ARTESANAL

A contaminação artificial do QMA foi realizada no Laboratório de Análise de Alimentos e Águas, localizado na Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora (LAAA). Com a massa celular obtida no meio de cultura Brucella com carvão ativo preparado no tópico anterior, foi preparada uma suspensão de células a 10^8 UFC/mL

adicionando colônias da bactéria cultivada em tubo contendo 9 mL de solução salina 0,85%. A concentração foi verificada pela densidade ótica (DO) entre 0,100 e 0,200, em comprimento de onda de 625 nm.

A partir da suspensão original (10^8 UFC/mL), foram preparadas diluições seriadas a fim de obter suspensões bacterianas contendo 10^8 , 10^6 , 10^5 , 10^4 e 10^2 UFC/mL. Um mililitro de cada estirpe foi adicionado a um tubo de ensaio, um tubo para cada concentração, totalizando 2 mL de mix de *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli*. O mix foi adicionado a 55 g de queijo, assepticamente pesado em saco estéril, resultando em amostras de queijo contaminadas com 10^6 UFC/mL, 10^4 UFC/mL, 10^3 UFC/mL, 10^2 UFC/mL e 1 UFC/mL. A mistura foi homogeneizada vigorosamente e dividida em duas porções: 5 g para análise de PCR e 50 g para análise da amostra pelo método convencional. Também foi utilizado nesse ensaio um controle negativo, apenas com a amostra de queijo sem inoculação da bactéria.

A DO e a concentração real de bactérias adicionadas no queijo foram confirmadas por meio do plaqueamento de 0,1 mL das diluições 10^{-6} (10^2 UFC/mL) e 10^{-7} (10^1 UFC/mL) em agar Brucella com carvão ativo e contagem das colônias crescidas nas placas após incubação a 42° C por 48 horas, em atmosfera de microaerofilia.

4.3 EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE DNA DE *Campylobacter* spp. EM CULTURAS PURAS

As extrações de DNA foram realizadas no Laboratório de Microbiologia do Leite (LML), na EMBRAPA Gado de Leite, Juiz de Fora. O procedimento iniciou-se com o preparo da suspensão bacteriana adicionando toda a massa celular obtida na placa de meio Brucella com carvão ativo em um micro tubo contendo 1 mL de solução salina (0,85%). A suspensão foi centrifugada a 12000 RPM por 5 minutos, descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se

o sedimento em 100 μ L de TE (Tris HCl 10 mM + EDTA 1 mM). Foi adicionado 20 μ L de SDS 20% e 20 μ L de proteinase K. A amostra foi homogeneizada por inversão e incubada a 56°C por 50 minutos. Foi adicionado 500 μ L de TE, seguido de homogeneização e fervura a 100°C por 15 minutos. Centrifugou-se a 14000 RPM por 5 minutos e o sobrenadante foi coletado em um novo tubo. Adicionou-se 10 μ L de RNase e a amostra foi deixada em temperatura ambiente por 1 hora. Foi realizada a desproteinização com 600 μ L de fenol/clorofórmio (1:1). A mistura foi centrifugada a 14000 RPM por 5 minutos e o sobrenadante foi coletado em um novo tubo. Essa etapa foi repetida substituindo o fenol/clorofórmio por apenas clorofórmio. Ao sobrenadante final foi adicionado acetato de amônio 7M (na proporção de 1/3 do volume da solução obtida no passo anterior) e 1 mL de etanol 100%. A amostra foi homogeneizada e deixada no freezer por, pelo menos, 2 horas. Após esse tempo, centrifugou-se a 14000 RPM por 5 minutos e o sobrenadante foi descartado. O sedimento foi cuidadosamente lavado com etanol 70% e o microtubo foi deixado à temperatura ambiente para secagem do pellet. O DNA extraído foi dissolvido em 150 μ L de água deionizada e quantificado no Nanodrop™.

4.4 EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE DNA TOTAL EM QUEIJO MINAS ARTESANAL

Dois gramas do queijo foram pesados em tubo Falcon de 50 mL. Ao mesmo Falcon foram adicionados 10 mL de tampão de lise alimentar (Tris HCl 50 mM + EDTA 10 mM + SDS 5%) e 25 μ L de proteinase K. A amostra foi homogeneizada e incubada a 60°C durante pelo menos 30 minutos com agitação intermitente. Após incubação, resfriou-se a amostra e centrifugou-se durante 10 minutos a 2500 x g. O sobrenadante foi transferido para um tubo Falcon de 15 mL. Foi adicionado 35 μ L de RNase e a amostra foi deixada em temperatura ambiente por 1 hora. Foi realizada a desproteinização com 5 mL de fenol/clorofórmio gelado (1:1). A mistura foi centrifugada a 4450 rpm por 20 minutos em centrifuga refrigerada a 4°C e

o sobrenadante foi coletado em um novo tubo. Essa etapa foi repetida substituindo o fenol/clorofórmio por apenas clorofórmio gelado. Ao sobrenadante final foi adicionado acetato de amônio 7M (na proporção de 1/3 do volume da solução obtida no passo anterior) e a amostra foi homogeneizada. Toda solução obtida no passo anterior foi distribuída em micro tubos de 2 mL, aliquotando 1 mL para cada tubo. À todos os tubos foi adicionado 1 mL de etanol absoluto e homogeneizado. Os tubos foram deixados no freezer por pelo menos 2 horas. Centrifugou-se a 17.900 x g por 15 minutos e o sobrenadante foi descartado. O sedimento foi cuidadosamente lavado com etanol 70% gelado e os tubos foram deixados à temperatura ambiente para a secagem do pellet. O DNA extraído foi dissolvido em 300 µ L de água deionizada e quantificado no Nanodrop™.

A qualidade do DNA extraído foi avaliada aplicando 2 µ L do DNA concentrado de cinco amostras aleatoriamente selecionadas, em um gel de agarose 0,8%, a 120 V. O marcador de peso molecular utilizado foi o de 1 kb (Ludwig, Rio Grande do Sul, Brasil).

4.5 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE

4.5.1 Primers

Os primers empregados no experimento foram adquiridos da Integrated DNA Technologies® (Skokie, Illinois, EUA). Sequências de primers para o gene *16S rRNA* foram utilizadas para identificar o gênero *Campylobacter* nas amostras. As espécies foram identificadas usando sequências de primers para detectar o gene da hipuricase (*hipO*) específico para *C. jejuni* e o gene de transporte de sideróforos (*ceuE*) específico para *C. coli*. Segue a Tabela 1 com o resumo das informações para cada primer.

Tabela 1. Primers usados na amplificação de fragmentos de DNA específicos do gênero *Campylobacter* spp. e das espécies *C. jejuni* e *C. coli*.

Gene alvo	Microrganismo identificado	Sequência de nucleotídeos (5'-3')	Amplicon (bp)	Temperatura anelamento	Referência
16S rRNA	<i>Campylobacter</i> spp.	ATCTAATGGCTTAACCATTAAAC	857	59° C	DENIS et al. (1999)
		GGACGGTAACTAGTTTAGTAT			
hipO	<i>C. jejuni</i>	GAAGAGGGTTTGGGTGGTG	735	66° C	LINTON et al. (1997)
		AGCTAGCTTCGCATAATAACTTG			
ceuE	<i>C. coli</i>	TGATTTTATTATTTGTAGCAGCG	462	59° C	DENIS et al. (1999)
		AATTGAAAATTGCTCCAACATATG			

4.5.2 PCR monoplex

Para avaliar os primers *16S rRNA*, *hipO* e *ceuE*, o DNA de cinco amostras foram submetidos a PCR monoplex, as mesmas utilizadas posteriormente na padronização da PCR multiplex. Estes são: DNA extraído de cultura pura de *C. jejuni* (CCAMP 492), DNA extraído de cultura pura de *C. coli* (CCAMP 1004), mix do DNA extraído de cultura pura de *C. jejuni* e *C. coli* (proporção 1:1), DNA extraído de duas porções de queijo do Serro artificialmente contaminado com massa celular de *C. jejuni* e *C. coli* adicionadas em conjunto ao queijo.

As reações foram realizadas para um volume final de 25,0 µL/amostra, cuja distribuição de volume dos reagentes encontra-se listada no Quadro 2 abaixo. O kit de PCR utilizado foi o Ludwig (Rio Grande do Sul, Brasil).

Quadro 2. Volume dos reagentes empregados no preparo do mix da PCR monoplex

Reagente/Estoque	Concentração da solução estoque	Concentração na reação	Volume (µL)
Água	-	q.s.p.	17,8
Tampão Tris-HCl	10 X	1 X	2,5
MgCl ₂	50 mM	2 mM	1,0
dNTP (mix)	10 mM	0,2 mM	0,5
Primer Forward	10 pmol	0,4 pmol	1,0
Primer Reverse	10 pmol	0,4 pmol	1,0
Taq DNA Polimerase	5 U/µL	0,04 U/µL	0,2
DNA	10 ng/µL	0,4 ng/µL	1,0

Fonte: o autor.

As condições de amplificação no termociclador estão descritas no Quadro 3.

Quadro 3. Ciclo de amplificação para cada primer testado no trabalho

Temperatura / Tempo	Genes		
	<i>16S rRNA</i>	<i>hipO</i>	<i>ceuE</i>
Desnaturação inicial	96° C / 2 min	96° C / 2 min	96° C / 2 min
Desnaturação	95° C / 30 s	95° C / 30 s	95° C / 30 s
Anelamento	59° C / 45 s	66° C / 45 s	59° C / 45 s
Extensão	72° C / 1 min	72° C / 1 min	72° C / 1 min
Extensão final	72° C / 5 min	72° C / 5 min	72° C / 5 min
Número de ciclos	35	35	35

Fonte: o autor.

4.5.3 Padronização da PCR multiplex

O ponto de partida para padronização da PCR multiplex foi a PCR monoplex apresentada no tópico acima, considerada o teste 1 da padronização. Baseado na reação simples que é usada para cada gene, os parâmetros da reação foram sendo ajustados a fim de obter um resultado satisfatório visando a amplificação dos três genes *16Sr RNA*, *hipO* e *ceuE* na mesma reação. Para este teste foram utilizadas as seguintes amostras: DNA extraído de cultura pura de *C. jejuni* (CCAMP 492), DNA extraído de cultura pura de *C. coli* (CCAMP 1004) e DNA extraído de queijo artificialmente contaminado com massa celular de *C. jejuni* e *C. coli* misturadas entre si.

No segundo teste a concentração do gel de agarose foi diminuída de 1,5% para 1,0% e a voltagem da corrida também foi alterada de 120V para 180 V. Neste teste, e em todos os outros a seguir, as amostras utilizadas foram: DNA extraído de cultura pura de *C. jejuni* (CCAMP 492), DNA extraído de cultura pura de *C. coli* (CCAMP 1004), mix do DNA extraído de cultura pura de *C. jejuni* e *C. coli* (1:1), DNA extraído de duas porções de queijo artificialmente contaminado com massa celular de *C. jejuni* e *C. coli* adicionadas em conjunto.

No terceiro teste foi modificada a concentração de Mg^{2+} na reação. O volume de $MgCl_2$ adicionado foi ajustado de 1,0 μL para 2,0 μL , aumentando a concentração do íon de 2 mM para 4 mM.

No quarto teste dois elementos foram alterados: a solução tampão e a temperatura de anelamento. O volume de tampão adicionado à reação foi aumentado de 2,5 μL para 3,5 μL e a temperatura de anelamento ajustada de 66° C para 62° C.

Um último teste foi realizado, diminuindo a concentração de DNA aplicado à reação. O DNA extraído foi diluído para 5 ng/ μL . A Tabela 2 expressa o resumo dos testes que foram realizados. Em destaque estão os pontos que foram alterados em cada teste.

Tabela 2. Testes realizados para a padronização da PCR multiplex para identificação de *Campylobacter* spp., *C. jejuni* e *C. coli*

Parâmetros da reação	Testes				
	1	2	3	4	5
Volume de Tampão (μL)	2,5	2,5	2,5	3,5	3,5
Volume de $MgCl_2$ (μL)	1,0	1,0	2,0	2,0	2,0
Volume de Primers (μL)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Volume de dntP (μL)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Volume de Taq Polimerase (μL)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Concentração de DNA (ng/ μL)	10,0	10,0	10,0	10,0	5,0
Concentração do gel (%)	1,5	1,0	1,0	1,0	1,0
Voltagem (V)	120	80	80	80	80
Temperatura de anelamento (° C)	66	66	66	62	62

4.5.4 Análise da PCR em gel de agarose

Para as PCRs monoplex, 10 μL de cada produto de reação foram aplicados e analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,5 % em tampão TBE 1 X (0,09 M Tris-Borato e 2 mM EDTA, pH 8,0), submetidos à voltagem de 120 V. Para as PCRs multiplex, o gel de agarose utilizado foi de 1,0% e a voltagem foi de 80 V. Para analisar a qualidade do DNA extraído, foi aplicado 2 μL do DNA concentrado, em gel de agarose 0,8%, a 120 V.

Para análise do tamanho do fragmento gerado na reação de PCR foi utilizado um marcador de peso molecular de 100 bp (Ashermam, Waltham, EUA e Amresco, Ontario, Canadá). Os géis contendo os fragmentos de DNA amplificados foram corados com brometo de etídio e fotografados sob luz ultravioleta (300-320 nm).

4.5.5 Estimativa do limite de detecção das PCRs monoplex e multiplex

A estimativa do limite de detecção do método foi realizada com as amostras de queijo do Serro artificialmente contaminadas com *C. jejuni* e *C. coli* na concentração de bactérias de 10^6 UFC/mL, 10^4 UFC/mL, 10^3 UFC/mL, 10^2 UFC/mL e 1 UFC/mL. A diluição seriada partiu de uma suspensão de 10^8 UFC/mL.

A extração do DNA das amostras foi realizada tanto diretamente dos queijos, quanto de um concentrado de células obtido pela adição de água peptonada 1% e centrifugação a 20.000 x g por 40 minutos. Os DNAs extraídos foram primeiramente submetidos a PCR monoplex para o gene *16S rRNA* e, em seguida, aplicada à multiplex nas mesmas condições da padronização. As PCRs foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 1,0%.

4.5.6 Análise de restrição dos amplicons

O teste com enzimas de restrição foi realizado para o DNA extraído do queijo artificialmente contaminado com *C. jejuni* e *C. coli*. O objetivo do teste foi confirmar que o DNA do microrganismo inoculado foi verdadeiramente recuperado na extração do queijo e que os fragmentos de DNA que estão sendo amplificados pela PCR multiplex padronizada é realmente *C. coli* e *C. jejuni*. Consequentemente, esse teste avalia a efetividade do método para a detecção de fragmentos de DNA específicos de *Campylobacter* spp., *C. coli* e *C. jejuni* em amostras de QMA.

Por meio do programa NebCutter® v. 2.0, os mapas de restrição foram obtidos para cada sequência dos genes analisados nesse trabalho (*16S rRNA*, *hipO* e *ceuE*). Para cada gene foi escolhido uma enzima para o teste: para o *16S rRNA* foi escolhido a enzima *XhoI*, para o *hipO* a enzima *HhaI* e para o *ceuE* a enzima *HindIII*. Os mapas de restrição estão representados nas figuras abaixo, com destaque para a enzima escolhida para a realização do teste. Os critérios de escolha foram a disponibilidade da enzima no estoque do laboratório e a possibilidade de separação dos fragmentos gerados na eletroforese em gel de agarose.

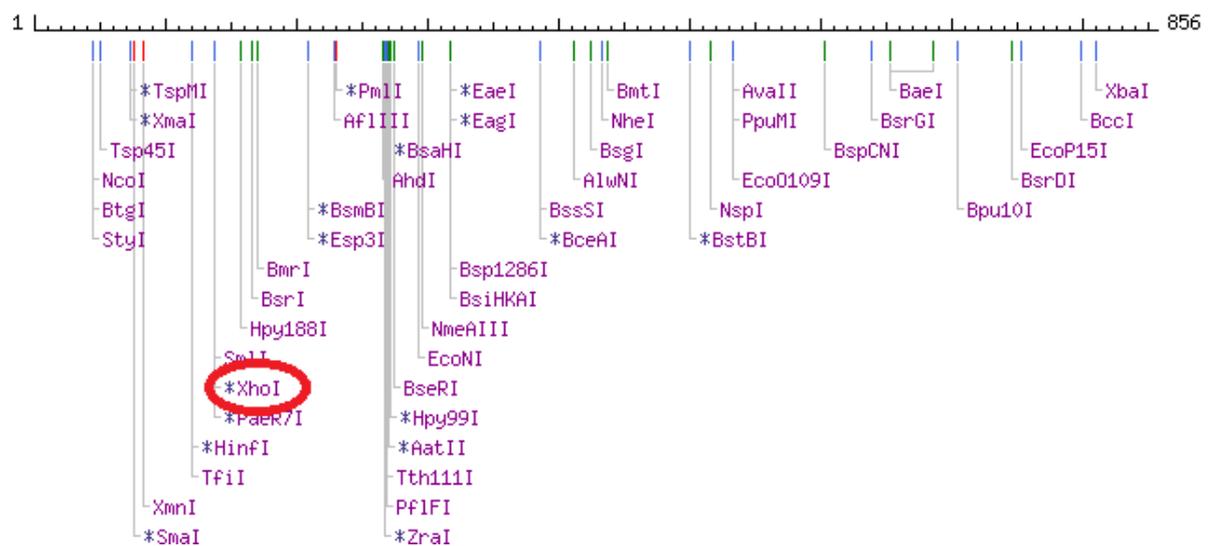


Figura 4. Mapa de restrição para a sequência de 857 pb do gene *16S rRNA*

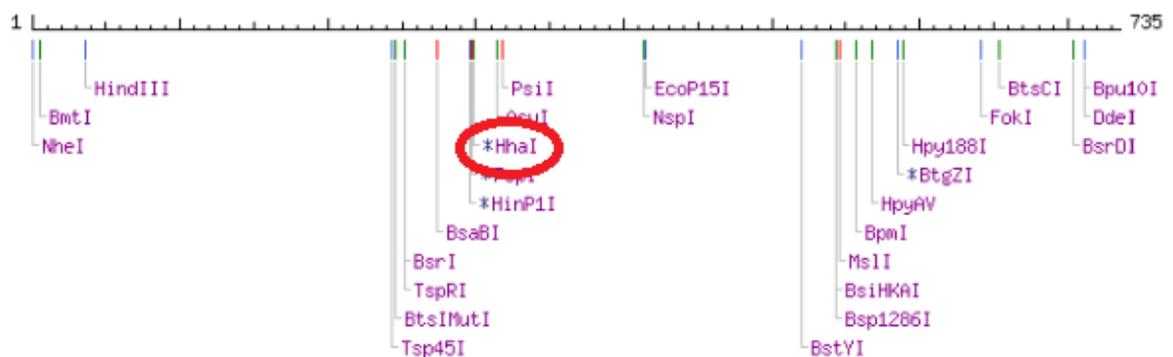


Figura 5. Mapa de restrição para a sequência de 735 pb do gene *hipO*

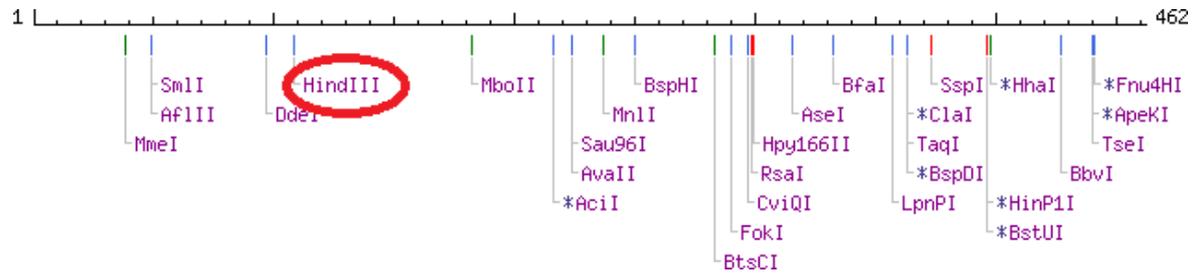


Figura 6. Mapa de enzimas de restrição para a sequência de 462 pb do gene *ceuE*

Primeiramente, foi realizada a PCR monoplex para cada primer, utilizando o DNA extraído do queijo artificialmente contaminado com *C. jejuni* e *C. coli*. Com o produto da PCR, foi realizada a reação com cada enzima de acordo com as informações do fabricante (Promega, Wisconsin, EUA). Os reagentes utilizados, as quantidades adicionadas e as condições da reação estão descritos na Tabela 3. As reações foram realizadas para um volume final de 20,0 μ L/amostra.

Tabela 3. Reagentes e condições da clivagem dos fragmentos de DNA com enzimas de restrição

<i>16S rRNA</i>		<i>hipO</i>		<i>ceuE</i>	
Reagentes/ condições	Quantidade	Reagentes/ condições	Quantidade	Reagentes/ condições	Quantidade
Enzima XhoI	0,5 μ L	Enzima HhaI	0,5 μ L	Enzima HindIII	0,5 μ L
Água Mili Q	2,3 μ L	Água Mili Q	2,3 μ L	Água Mili Q	2,3 μ L
Tampão D	2,0 μ L	Tampão M	2,0 μ L	Tampão E	2,0 μ L
Serum Bovino	0,2 μ L	Serum Bovino	0,2 μ L	Serum Bovino	0,2 μ L
Produto PCR	15,0 μ L	Produto PCR	15,0 μ L	Produto PCR	15,0 μ L
Temp. ótima	37 °C	Temp. ótima	37 °C	Temp. ótima	37 °C
Tempo de ação	1 - 4 horas	Tempo de ação	1 - 4 horas	Tempo de ação	1 - 4 horas

Após a incubação, o resultado das reações foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1,0%.

4.6 DETERMINAÇÃO DA PREVALÊNCIA DE *Campylobacter* spp. EM AMOSTRAS DE QUEIJO MINAS ARTESANAL

As amostras de queijo foram coletadas pela equipe de fiscais do Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA) entre fevereiro e março de 2018. Uma porção de cada queijo foi enviada para o Laboratório de Qualidade do Leite (LQL) da Embrapa Gado de Leite em caixas isotérmicas com gelo reciclável, mantidas em temperatura menor que 4° C. No total foram testadas 81 amostras e cada amostra representa uma propriedade, todas cadastradas no IMA. As propriedades abrangem as regiões do Serro, Cerrado, Triângulo Mineiro e Canastra.

O DNA total dos queijos foi extraído no Laboratório de Microbiologia do Leite (LML), na EMBRAPA Gado de Leite, Juiz de Fora, de acordo com o protocolo descrito no tópico 4.3 deste trabalho. Os 81 produtos de DNA extraídos foram analisados pela PCR multiplex padronizada neste estudo, para os genes *16S rRNA*, *hipO* e *ceuE*. Além disso, para confirmação do resultado, as amostras foram também testadas pela PCR monoplex para cada primer em estudo, conforme metodologia na página 47.

5. RESULTADOS

5.1 AVALIAÇÃO DOS PRIMERS PARA OS GENES *16S rRNA*, *hipO* E *ceuE* POR PCR MONOPLEX

As figuras 7, 8 e 9 mostram o resultado das PCRs monoplex para cada primer por eletroforese em gel de agarose.

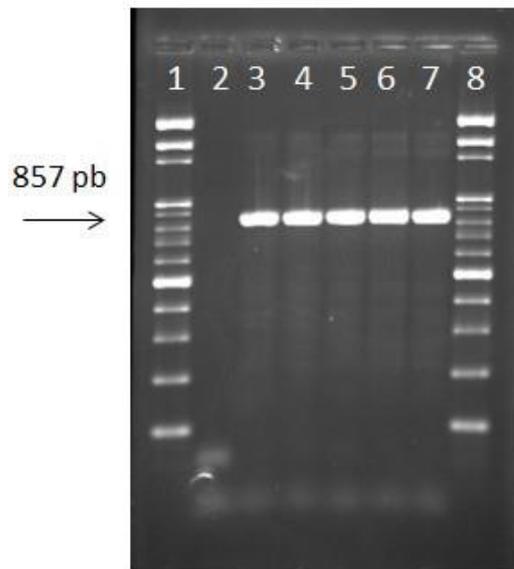


Figura 7. Identificação do gênero *Campylobacter* spp. pelo primer *16S rRNA* por PCR monoplex. (1) marcador de peso molecular (de 100 em 100 pb, Amresco); (2) branco da reação; (3) cultura pura de *C. jejuni* (CCAMP 492); (4) cultura pura de *C. coli* (CCAMP 1004); (5) mix das culturas puras de *C. jejuni* e *C. coli*; (6) porção 1 do queijo artificialmente contaminado com *C. jejuni* e *C. coli*; (7) porção 2 do queijo artificialmente contaminado com *C. jejuni* e *C. coli*.

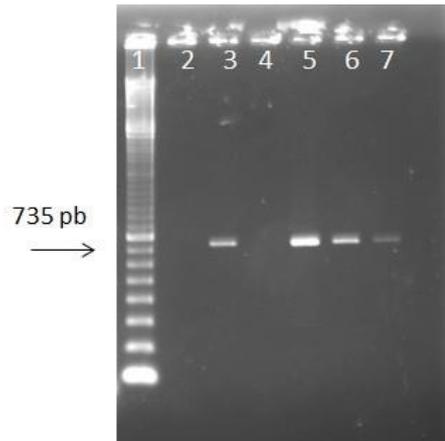


Figura 8. Identificação da espécie *C. jejuni* pelo primer *hipO* por PCR monoplex. (1) marcador de peso molecular (de 100 em 100 pb, Amersham, EUA); (2) branco da reação; (3) cultura pura de *C. jejuni* (CCAMP 492); (4) cultura pura de *C. coli* (CCAMP 1004); (5) mix das culturas puras de *C. jejuni* e *C. coli*; (6) porção 1 do queijo artificialmente contaminado com *C. jejuni* e *C. coli*; (7) porção 2 do queijo artificialmente contaminado com *C. jejuni* e *C. coli*.

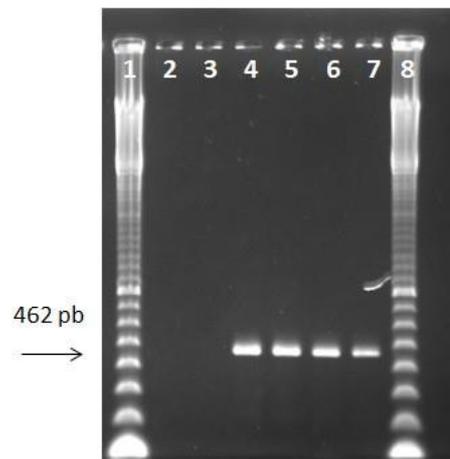


Figura 9. Identificação da espécie *C. coli* pelo primer *ceuE* por PCR monoplex. (1) marcador de peso molecular (de 100 em 100 pb, Amersham, EUA); (2) branco da reação; (3) cultura pura de *C. jejuni* (CCAMP 492); (4) cultura pura de *C. coli* (CCAMP 1004); (5) mix das culturas puras de *C. jejuni* e *C. coli*; (6) porção 1 do queijo artificialmente contaminado com *C. jejuni* e *C. coli*; (7) porção 2 do queijo artificialmente contaminado com *C. jejuni* e *C. coli*.

Os resultados demonstraram que os primers para os genes *16S rRNA*, *hipO* e *ceuE* são eficientes para a detecção de *Campylobacter* spp., *C. jejuni* e *C. coli*, respectivamente, por PCR monoplex. Os primers apresentaram bom desempenho na detecção tanto do DNA das espécies de bactérias isoladas por cultivo, estando puras ou misturadas entre si, bem como para detectar o DNA extraído do queijo artificialmente contaminado com as duas espécies.

5.2 PADRONIZAÇÃO DE PCR MULTIPLEX PARA DETECÇÃO DE *Campylobacter* spp., *Campylobacter jejuni* E *Campylobacter coli*

Resultado do teste 1 da padronização da PCR multiplex

A figura 10 mostra o resultado do gel de agarose do teste 1 da padronização da PCR multiplex. Nesse primeiro teste não foi possível observar a separação das bandas dos fragmentos 867 pb e 735 pb e o DNA de *C. coli* não foi amplificado, uma vez que não foi obtido banda na altura do fragmento 462 pb.

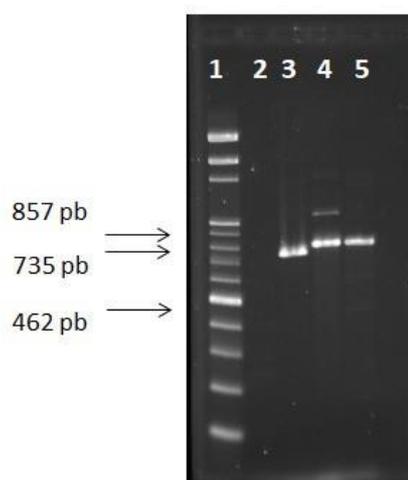


Figura 10. Teste 1 da padronização da PCR multiplex para a detecção de *Campylobacter* spp. (857 pb) e diferenciação das espécies *C. jejuni* (735 pb) e *C. coli* (462 pb). (1) marcador de peso molecular (de 100 em 100 pb, Amresco, Canadá); (2) branco da reação; (3) cultura pura

de *C. jejuni* (CCAMP 492); (4) cultura pura de *C. coli* (CCAMP 1004); (5) queijo artificialmente contaminado com *C. jejuni* e *C. coli*.

Resultado do teste 2 da padronização da PCR multiplex

A figura 11 mostra o resultado do gel de agarose do teste 2 da padronização da PCR multiplex. Nesse segundo teste é possível observar as duas bandas correspondentes aos fragmentos 867 pb e 735 pb, entretanto estas ainda estão sobrepostas. Além disso, o fragmento de 462 pb foi visualizado em uma das amostras, na canaleta 5, porém para as outras amostras não ocorreu a amplificação deste fragmento.

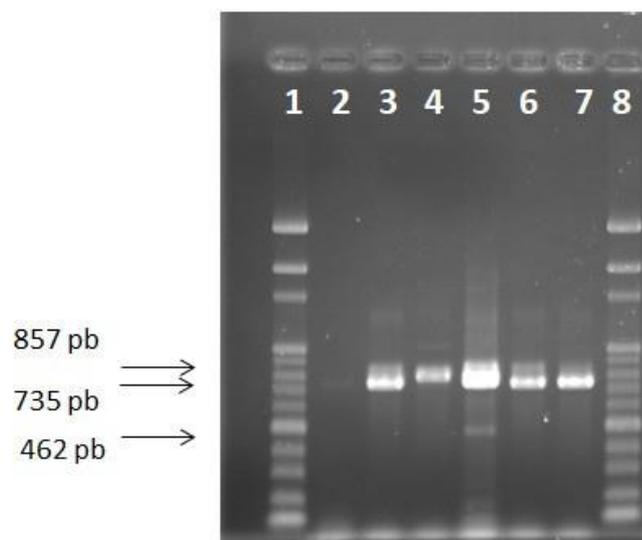


Figura 11. Teste 2 da padronização da PCR multiplex para a detecção de *Campylobacter* spp. (857 pb) e diferenciação das espécies *C. jejuni* (735 pb) e *C. coli* (462 pb). (1) e (8) marcador de peso molecular (de 100 em 100 pb, Amresco, Canadá); (2) branco da reação; (3) cultura pura de *C. jejuni* (CCAMP 492); (4) cultura pura de *C. coli* (CCAMP 1004); (5) mix das culturas puras de *C. jejuni* e *C. coli*; (6) porção 1 do queijo artificialmente contaminado com *C. jejuni* e *C. coli*; (7) porção 2 do queijo artificialmente contaminado com *C. jejuni* e *C. coli*.

Resultado do teste 3 da padronização da PCR multiplex

A figura 12 mostra o gel de agarose resultante do teste 3 da padronização da PCR multiplex. O resultado obtido nesta etapa demonstra que o ajuste realizado contribuiu positivamente para a separação das bandas dos fragmentos 867 pb e 735 pb e para a amplificação do DNA de *C. coli*.

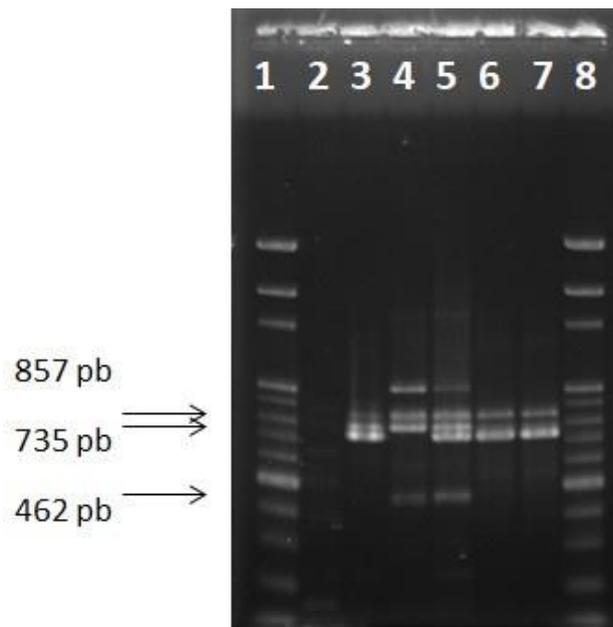


Figura 12. Teste 3 da padronização da PCR multiplex para a detecção de *Campylobacter* spp. (857 pb) e diferenciação das espécies *C. jejuni* (735 pb) e *C. coli* (462 pb). (1) e (8) marcador de peso molecular (de 100 em 100 pb, Amresco, Canadá); (2) branco da reação; (3) cultura pura de *C. jejuni* (CCAMP 492); (4) cultura pura de *C. coli* (CCAMP 1004); (5) mix das culturas puras de *C. jejuni* e *C. coli*; (6) porção 1 do queijo artificialmente contaminado com *C. jejuni* e *C. coli*; (7) porção 2 do queijo artificialmente contaminado com *C. jejuni* e *C. coli*.

Resultado do teste 4 da padronização da PCR multiplex

A figura 13 mostra o resultado do gel de agarose do teste 4 da padronização da PCR multiplex. O resultado alcançado neste teste foi satisfatório com relação à obtenção de uma PCR multiplex capaz de detectar *Campylobacter* spp. e diferenciar as espécies *C. jejuni* e *C. coli*. A amplificação dos genes alvo ocorreu da forma esperada: as amostras de cultura pura de *C. jejuni* apresentaram as bandas correspondentes aos fragmentos 867 pb e 735 pb e as de *C. coli* apresentaram as bandas 867 pb e 432 pb. Já as amostras de cultura pura e de queijo com coexistência das duas espécies tiveram as três bandas no gel. Além disso, o aparecimento de bandas inespecíficas foi reduzido.

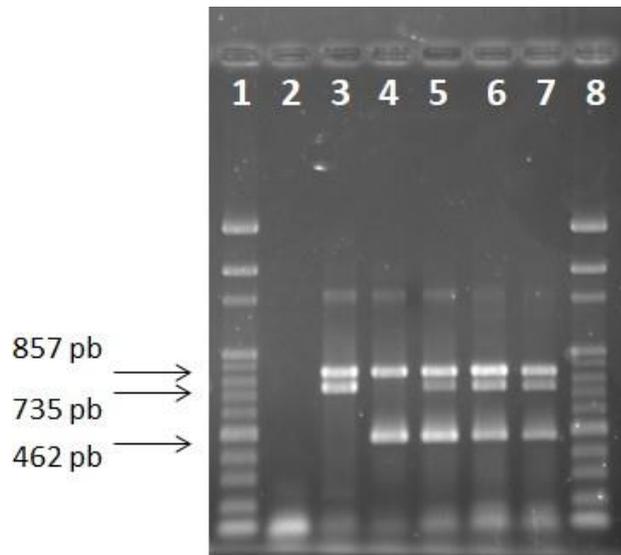


Figura 13. Teste 4 da padronização da PCR multiplex para a detecção de *Campylobacter* spp. (857 pb) e diferenciação das espécies *C. jejuni* (735 pb) e *C. coli* (462 pb). (1) e (8) marcador de peso molecular (de 100 em 100 pb, Amresco, Canadá); (2) branco da reação; (3) cultura pura de *C. jejuni* (CCAMP 492); (4) cultura pura de *C. coli* (CCAMP 1004); (5) mix das culturas puras de *C. jejuni* e *C. coli*; (6) porção 1 do queijo artificialmente contaminado com *C. jejuni* e *C. coli*; (7) porção 2 do queijo artificialmente contaminado com *C. jejuni* e *C. coli*.

Resultado do teste 5 da padronização da PCR multiplex

O resultado obtido no teste 5 é demonstrado pela figura 14. A diminuição da concentração do DNA contribuiu positivamente para a resolução do gel e não trouxe nenhum prejuízo para a amplificação ou para a visualização das bandas. Pelo contrário, as bandas se apresentaram bem separadas e delimitadas, com redução do arraste. A figura 14 corresponde ao resultado final da padronização da PCR multiplex.

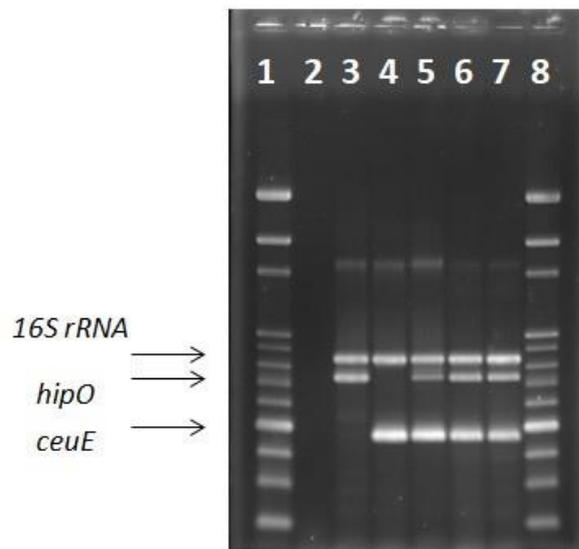


Figura 14. Teste 5 da padronização da PCR multiplex para a detecção de *Campylobacter* spp. (857 pb) e diferenciação das espécies *C. jejuni* (735 pb) e *C. coli* (462 pb). (1) e (8) marcador de peso molecular (de 100 em 100 pb, Amresco, Canadá); (2) branco da reação; (3) cultura pura de *C. jejuni* (CCAMP 492); (4) cultura pura de *C. coli* (CCAMP 1004); (5) mix das culturas puras de *C. jejuni* e *C. coli*; (6) porção 1 do queijo artificialmente contaminado com *C. jejuni* e *C. coli*; (7) porção 2 do queijo artificialmente contaminado com *C. jejuni* e *C. coli*.

5.2.1 Limite de detecção do método

A determinação do limite de detecção foi realizada pelo método de densidade ótica. Na análise da DO, a suspensão inicial apresentou absorvância de 0,123, dentro da faixa esperada. Entretanto, no teste de confirmação por cultivo, foi verificado que a DO estava a

10^7 UFC/mL. Sendo assim, as concentrações foram avaliadas considerando 10^1 UFC/mL a menos em cada uma delas.

O resultado da PCR monoplex para o gene *16S rRNA* está demonstrado nas figuras 14 e 15, tanto para as amostras de queijo como para o concentrado de células do queijo.

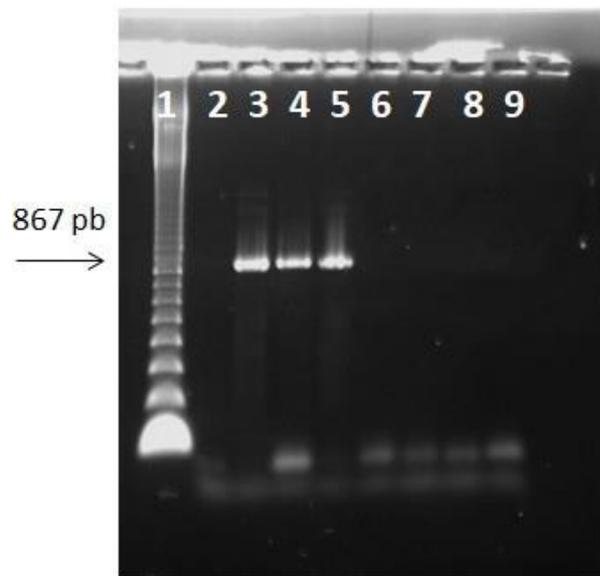


Figura 15. Avaliação do limite de detecção de PCR monoplex para detecção de *Campylobacter* spp. em amostras de queijo minas artesanal. (1) marcador de peso molecular (de 100 em 100 pb, Amersham, EUA); (2) branco da reação; (3) controle positivo; (4) 10^5 UFC/mL; (5) 10^3 UFC/mL; (6) 10^2 UFC/mL; (7) 10^1 UFC/mL; (8) 0,1 UFC/mL; (9) controle negativo (amostra de queijo sem inoculação de bactéria).

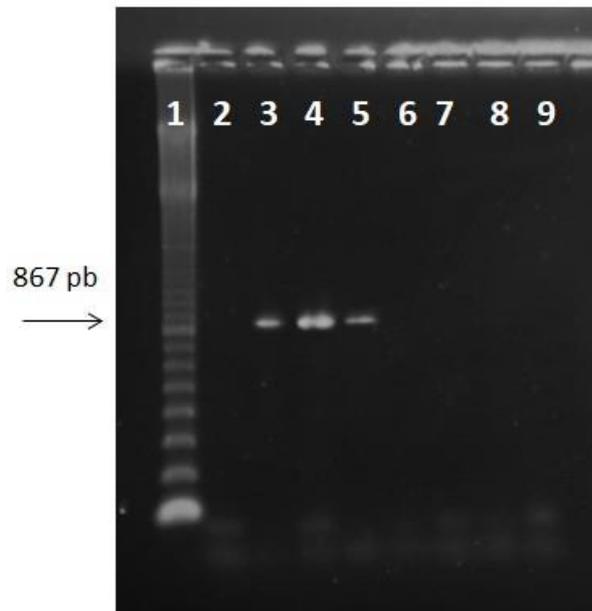


Figura 16. Avaliação do limite de detecção de PCR monoplex para detecção de *Campylobacter* spp. em concentrado de células de amostras de queijo minas artesanal. (1) marcador de peso molecular (de 100 em 100 pb, Amersham, EUA); (2) branco da reação; (3) controle positivo; (4) 10^5 UFC/mL; (5) 10^3 UFC/mL; (6) 10^2 UFC/mL; (7) 10^1 UFC/mL; (8) 0,1 UFC/mL; (9) controle negativo.

O resultado obtido mostrou que a PCR convencional para o gene *16S rRNA* é capaz de detectar até a concentração de 10^3 UFC/mL de *Campylobacter* spp. nas amostras avaliadas. Além disso, foi verificado que a etapa de concentração de células presentes no queijo não contribuiu positivamente para a melhoria da sensibilidade do método, uma vez que foi obtido o mesmo limite de detecção tanto para o concentrado de células como para a amostra de queijo *in natura*.

Como não foi encontrado diferença entre as amostras de concentrado de células e queijo, foram utilizados apenas os DNAs extraídos diretamente do queijo para a avaliação do limite de detecção da PCR multiplex padronizada para a detecção de *Campylobacter* spp., *C. jejuni* e *C. coli*. O resultado encontra-se na figura 17.

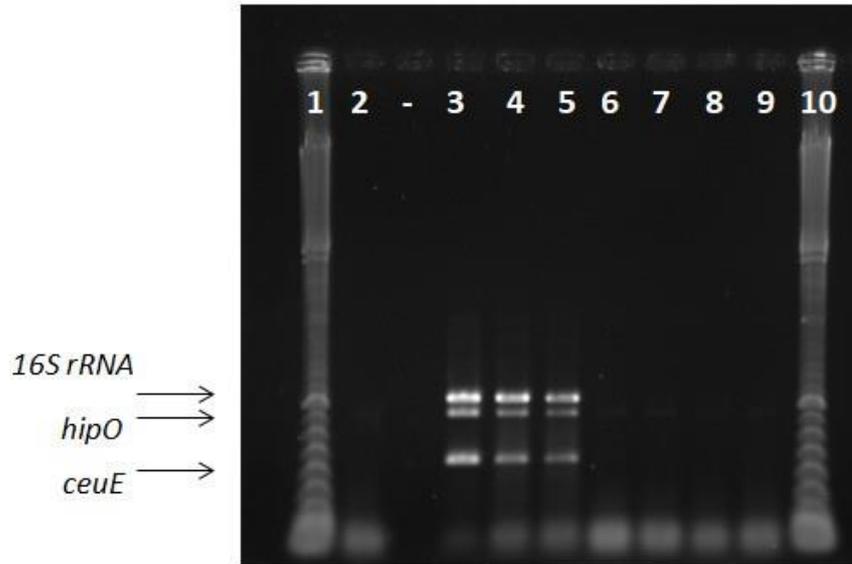


Figura 17. Avaliação do limite de detecção de PCR multiplex padronizada para detecção de *Campylobacter* spp., *C. jejuni* e *C. coli* em amostras de queijo minas artesanal. (1) e (10) marcador de peso molecular (de 100 em 100 pb, Amersham, EUA); (2) branco da reação; (3) controle positivo; (4) 10^5 UFC/mL; (5) 10^3 UFC/mL; (6) 10^2 UFC/mL; (7) 10^1 UFC/mL; (8) 0,1 UFC/mL; (9) controle negativo.

Assim como foi obtido para a PCR monoplex, o resultado encontrado acima mostrou que a PCR multiplex para os genes *16S rRNA*, *hipO* e *ceuE* é capaz de detectar e realizar a diferenciação entre espécies até a concentração de 10^3 UFC/mL de *Campylobacter* spp. nas amostras avaliadas. Sendo assim, a presença ou a ausência do patógeno é corretamente indicada como $> 10^3$ UFC/mL ou $< 10^3$ UFC/mL, respectivamente, uma vez que abaixo da concentração de 10^3 UFC/mL não é possível avaliar a presença do patógeno.

5.2.2 Análise de restrição dos amplicons

O resultado obtido no teste com as enzimas de restrição foi o esperado. A enzima *XhoI* para o gene *16S rRNA* clivou o fragmento de DNA amplificado de 140 pb, gerando dois fragmentos de DNA com cerca de 140 pb e 717 pb. Já a enzima *HhaI* para o *hipO* clivou o

fragmento de DNA amplificado de 300 pb e gerou dois fragmentos com cerca de 300 pb e 435 pb. Por fim, a enzima HindIII para o gene *ceuE* clivou o fragmento de DNA amplificado de 110 e os fragmentos gerados apresentaram cerca de 110 pb e 352 pb. Estes fragmentos foram visualizados por eletroforese em gel de agarose e a imagem do gel encontra-se na figura 18 abaixo. Para cada gene, foi aplicada no gel o produto da PCR antes e após a adição da enzima, para facilitar a visualização das bandas após a clivagem.

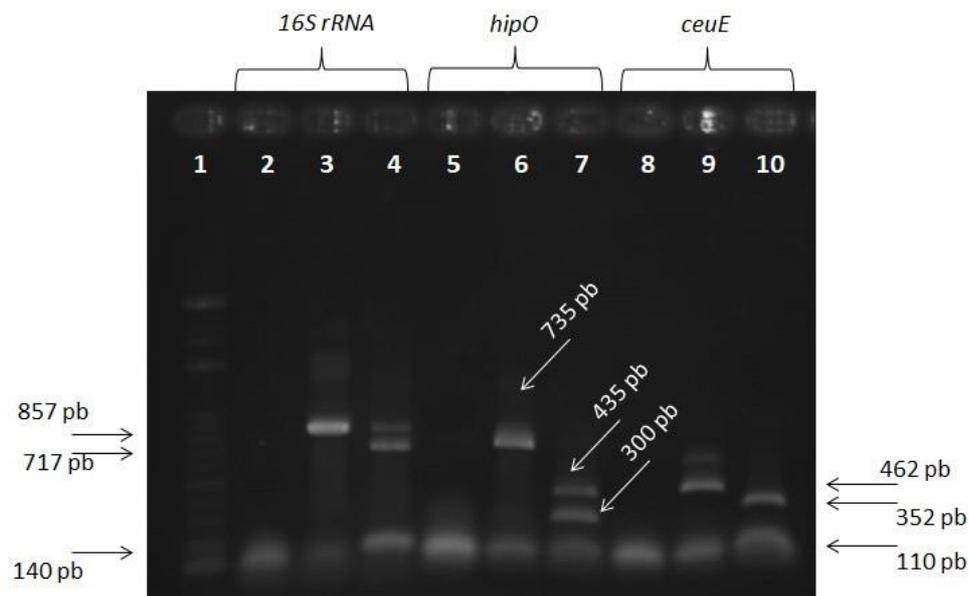


Figura 18. Teste com as enzimas de restrição XhoI, HhaI e HindIII para os genes *16S rRNA*, *hipO* e *ceuE*, respectivamente. (1) marcador de peso molecular (de 100 em 100 pb, Amresco, Canadá); (2) branco da reação do *16S rRNA*; (3) produto da reação do *16S rRNA* antes da clivagem; (4) reação da enzima XhoI; (5) branco da reação do *hipO*; (6) produto da reação do *hipO* antes da clivagem; (7) reação da enzima HhaI; (8) branco da reação do *ceuE*; (9) produto da reação do *ceuE* antes da clivagem; (10) reação da enzima HindIII.

Observa-se que para o gene *16S rRNA* ocorreu uma clivagem parcial, uma vez que parte do material amplificado não foi clivado e é visualizado no gel na altura de 857 pb. Para os genes *hipO* e *ceuE* a clivagem foi total, pois após ação da enzima não foi mais observado os fragmentos com 735 pb e 462 pb, respectivamente.

5.4 DETERMINAÇÃO DA PREVALÊNCIA DE *Campylobacter* spp. EM AMOSTRAS DE QUEIJO MINAS ARTESANAL

A fim de avaliar a ocorrência de *Campylobacter* spp. em amostras de QMA, a PCR multiplex padronizada nesse estudo foi aplicada em amostras provenientes de várias regiões produtoras, coletadas e enviadas pelo IMA. Oitenta e uma amostras foram submetidas à extração de DNA pelo método orgânico (fenol/clorofórmio). A figura 19 mostra a qualidade do DNA extraído de cinco amostras aleatoriamente selecionadas e, conseqüentemente, expressa a efetividade da extração realizada para QMA.

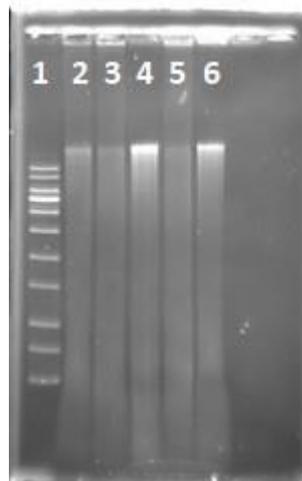


Figura 19. Avaliação da qualidade de DNA extraído de amostras de queijo minas artesanal pelo método orgânico de extração. (1) marcador de peso molecular (de 100 em 100 pb, Amresco, Canadá); (2) –(6) amostras de QMA aleatoriamente selecionadas.

Após a extração do DNA das amostras de QMA, estas foram avaliadas pela PCR multiplex padronizada nesse estudo e os resultados confirmados pela PCR monoplex para cada primer. Na análise do gel para o gene *16S rRNA*, 30 amostras foram inicialmente avaliadas como positivas para o gênero, considerando desde as amostras que apresentaram bandas bem definidas e intensas até as amostras que apresentaram bandas mais fracas na altura do fragmento 857 pb. Entretanto, quando essas amostras foram testadas na PCR

multiplex juntamente com amostras consideradas negativas, amostras que antes apresentaram banda na PCR monoplex do *16S rRNA*, não amplificaram. O contrário também aconteceu: amostras que foram consideradas negativas na PCR monoplex, apresentaram bandas na PCR multiplex. Além disso, amostras que apresentaram bandas na altura dos fragmentos de 735 pb e 462 pb na PCR multiplex, quando testadas na PCR monoplex para os genes *hipO* e *ceuE* não amplificaram. A figura 20 mostra um gel representativo da análise das amostras de QMA de campo por PCR multiplex para a detecção de *Campylobacter* spp., *C. jejuni* e *C. coli*.

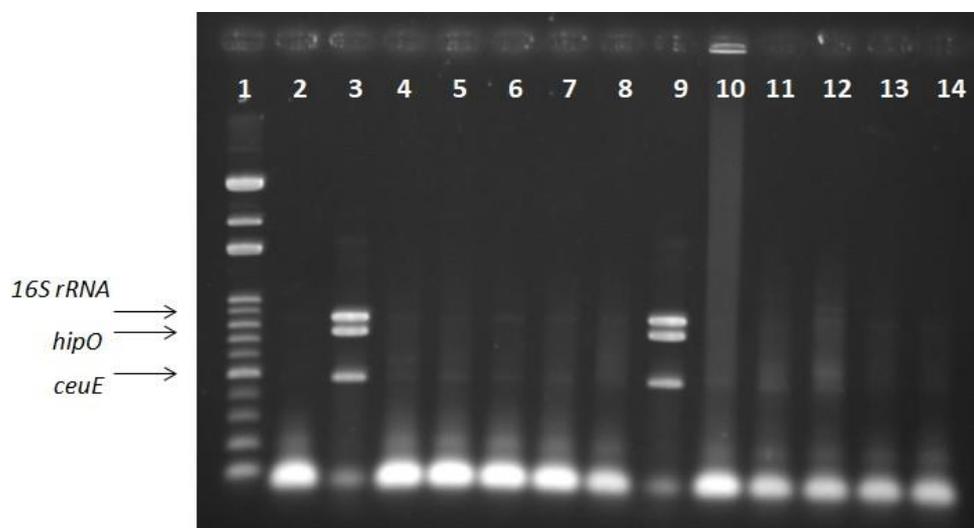


Figura 20. PCR multiplex para a detecção de *Campylobacter* spp. e diferenciação das espécies *C. jejuni* e *C. coli* em amostras de queijo minas artesanal de campo. (1) marcador de peso molecular (100 pb, Amresco, Canadá); (2) branco da reação; (3) e (9) controle positivo; (4) – (8) amostras de QMA de campo inicialmente consideradas positivas para o gene *16S sRNA*; (10) – (14) amostras de QMA de campo inicialmente consideradas negativas para o gene *16S sRNA*.

Nota-se que comparado com o controle positivo, algumas amostras apresentaram um arraste inesperado e bandas bem claras. Os resultados não foram conclusivos o suficiente para que fosse possível definir quais amostras eram positivas ou negativas para *Campylobacter* spp., tampouco realizar a diferenciação entre *C. jejuni* e *C. coli*.

6. DISCUSSÃO

6.1 AVALIAÇÃO DOS PRIMERS PARA OS GENES *16S rRNA*, *hip O* E *ceu E* POR PCR MONOPLEX

O RNA ribossomal, essencial para a sobrevivência dos organismos, é uma macromolécula altamente conservada entre as bactérias. O sequenciamento do gene 16S do RNA ribossomal (16S rRNA) é amplamente utilizado na classificação de microrganismos (BECKER, 2004). O gênero *Campylobacter* spp. tem mais de 400 sequências do gene 16S rRNA identificadas e presentes no banco de dados do Ribossomal Database Project (RDP) (MURALIDHARAN et al., 2016). Neste trabalho foram usados oligonucleotídeos iniciadores específicos para a região 16S rRNA para amplificação de um fragmento de DNA de 857 pb. Hungaro et al. (2015) usaram estes mesmos primers para a detecção de *Campylobacter* spp. em carcaças de frango. Já Fredrigo (2016) analisou amostras de carcaça e swabs retais de ovinos por PCR com primers 16S rRNA para uma região de 1004 pb.

O presente trabalho e os estudos apresentados anteriormente corroboram que, independente da região alvo ou da amostra estudada, o primer para o gene *16S rRNA* é eficiente na detecção do gênero *Campylobacter* por PCR monoplex. Entretanto, este primer não é capaz de distinguir entre *C. jejuni*, *C. coli* e *C. lari*, uma vez que essas espécies termofílicas apresentam sequências idênticas ou muito semelhantes para o gene *16S rRNA* (MURALIDHARAN et al., 2016). Assim, foram utilizados nesse trabalho os primers *hipO* e *ceuE* para realizar a identificação e diferenciação das espécies *C. jejuni* e *C. coli*, que são as mais envolvidas em surtos alimentares.

O gene *hipO* está presente apenas em *C. jejuni* entre as espécies de *Campylobacter* spp. e é responsável por regular a atividade da enzima hipuricase (N-benzoilglicina amido-hidrolase) (HANI, CHAN, 1995), responsável pela hidrólise do hipurato de sódio. Já o gene *ceuE* é um importante fator de virulência de *C. coli* e regula o sistema de transporte de

sideróforos (GONZALEZ et al. 1997). Sideróforos são metabólitos secundários, cuja função é se ligar ao ferro em condições de baixo ferro livre.

Hungaro et al. (2015), avaliando amostras de carcaça de frango, também utilizaram os primers *hipO* e *ceuE* na diferenciação das espécies *C. jejuni* e *C. coli*. Já Denis et al. (1999) e Arguello et al. (2015) em amostras de fezes e fontes avícolas, respectivamente, utilizaram o primer *ceuE* para identificação de *C. coli*, porém para *C. jejuni* o primer escolhido foi o *mapA* (589 pb). Um primer também encontrado na literatura para a detecção de *C. coli* é o *aspK* (500 pb), o qual foi utilizado por Silva et al. (2012) para avaliarem a presença dessa espécie em carcaça de suínos.

Existe uma variedade de primers que podem ser utilizados na pesquisa de *Campylobacter* spp. e na diferenciação das espécies de maior importância. Entretanto, não há nenhum trabalho na literatura que tenha combinado os primers *16S rRNA*, *hipO* e *ceuE* para a detecção de *Campylobacter* spp., *C. jejuni* e *C. coli*, respectivamente, em QMAs por PCR multiplex.

6.2 PADRONIZAÇÃO DE PCR MULTIPLEX PARA DETECÇÃO DE *Campylobacter* spp., *Campylobacter jejuni* E *Campylobacter coli*

A padronização de um método compreende os experimentos iniciais para implantação da técnica no laboratório. Incluem os primeiros testes com os reagentes e equipamentos para garantir que o material genético extraído de amostras de referência seja amplificado pela PCR ao serem utilizadas no diagnóstico (MAPA, 2015). Neste trabalho, as amostras de referência utilizadas foram DNAs extraídos de culturas puras de *C. jejuni* e *C. coli* e de queijos artificialmente contaminados com essas espécies. O uso de uma amostra de DNA extraída diretamente do queijo contaminado com *Campylobacter* foi importante para detectar possível

interferência na PCR por inibidores presentes neste derivado lácteo alvo dos métodos padronizados, por se tratar de uma matriz extremamente complexa.

Uma PCR multiplex foi padronizada utilizando os primers *16S rRNA*, *hipO* e *ceuE* para a detecção direta de *Campylobacter* spp. e diferenciação das espécies *C. jejuni* e *C. coli*. Por meio da avaliação *in silico* da sequência dos primers, pode-se afirmar que os genes escolhidos neste estudo são alvos apropriados para a detecção de *Campylobacter* spp., *C. jejuni* e *C. coli*. Adicionalmente, com o uso da ferramenta “pick primers” do National Center for Biotechnology Information (NCBI) foi constatado que as sequências dos primers *16S rRNA*, *hipO* e *ceuE* são específicas dos patógenos de interesse deste trabalho.

Uma sequência de testes foi realizada com o objetivo de padronizar a PCR multiplex. O primeiro ajuste foi feito na concentração do gel de agarose e na voltagem da corrida, o que implicou positivamente no início da separação das bandas correspondentes aos fragmentos de 857 e 735 pb. Este resultado foi explicado por Guo, Prinz e Staak (1992), que estudaram a influência da concentração de agarose e a força do campo elétrico na separação de fragmentos de DNA durante a eletroforese. Os autores mostraram que a redução na concentração de agarose acarreta no aumento da distância de migração (capacidade de separação) entre os fragmentos. Além disso, a mobilidade dos fragmentos de DNA diminui com a redução da intensidade do campo elétrico, o que dificulta a junção das bandas.

O próximo passo da padronização da PCR multiplex foi o ajuste da concentração de Mg^{2+} . O equilíbrio entre a concentração de $MgCl_2$ e de dNTP é essencial para o funcionamento da enzima *Taq* polimerase. Isso porque a enzima necessita do magnésio livre, entretanto este íon também se liga ao dNTP e ao DNA. Assim, neste trabalho determinou-se manter a concentração inicial de dNTP e aumentar a concentração de $MgCl_2$, o que resultou em um efeito positivo na amplificação do DNA. O mesmo procedimento foi adotado por

Henegariu et al. (1997) para obterem ampliações mais específicas e produtos de PCR com mais intensidade no gel.

Embora o aumento da concentração de $MgCl_2$ tenha influenciado positivamente na separação das bandas e na intensidade da amplificação, o tampão e a temperatura de anelamento parecem ter sido os dois parâmetros mais importantes na obtenção de altos rendimentos dos produtos específicos de PCR. O tampão utilizado neste trabalho é à base de cloreto de potássio (KCl), o mesmo tampão testado por Henegariu et al. (1997) em seu trabalho. Esses autores observaram que a concentração do tampão aumentada em duas vezes melhora a eficiência da reação de multiplex, principalmente para primers que geram pequenos amplicons, uma vez que estes funcionam melhor em concentrações mais altas de sal. Este apontamento explica o fato de a amplificação do gene *ceuE* ter sido acentuada com essa alteração e ter acontecido da maneira esperada. Algumas amostras com *C. coli* que não estavam apresentando a banda na altura de 462 pb nos testes anteriores passaram a apresentá-las após o aumento da concentração do tampão.

A temperatura ótima de anelamento para os primers *16S rRNA* e *ceuE* é de 59 °C, ao passo que a do primer *hipO* é de 66 °C. Com a combinação dos primers na PCR multiplex, a temperatura de anelamento foi alterada para 62 °C, que seria aproximadamente a média das duas temperaturas originais. Além disso, o volume de tampão adicionado à reação foi aumentado. Henegariu et al. (1997) mostraram que, apesar de alguns primers individualmente anelarem em temperaturas mais altas, quando são multiplexados é necessário abaixar a temperatura de 4 °C a 6 °C, o que converge com o que foi realizado neste experimento para o primer *hipO*. Nota-se que para os primers *16S rRNA* e *ceuE* o aumento da temperatura de 59 °C para 62 °C não impactou negativamente. Embora ampliações inespecíficas possam acontecer, as bandas inespecíficas podem ser encobertas pela amplificação concorrente de um

número maior de genes específicos na reação de multiplex e, assim, ficarem imperceptíveis (HENEGARIU et al., 1997).

Para finalizar o processo de padronização da PCR multiplex, foi avaliada a redução da concentração de DNA na reação, a fim de tornar ainda mais nítido a separação das bandas. Viera (2002) esclarece que o ideal é que o ácido nucléico esteja em uma concentração mínima de 5ng/μL, apesar de quantidades bem menores poderem ser utilizadas. Esta orientação coincide com a concentração de DNA utilizada neste estudo, que contribuiu para a melhoria da apresentação do gel. Além disso, o uso de menor quantidade de DNA na PCR, quando essa redução não compromete a amplificação, é favorável para o estoque de DNA. Este poderá ser utilizado mais vezes, sem necessidade de ser extraído novamente, otimizando tempo e custo.

6.2.1 Limite de detecção do método

Segundo o Manual de Verificação de Desempenho de Métodos para Diagnóstico Molecular de Doenças Infecciosas na Rede Nacional de Laboratórios Agropecuários (MAPA, 2015), o limite de detecção (LD) é um dos requisitos básicos para o início do processo de comprovação de desempenho de um método. Quando se trata de um método qualitativo, como é o caso de PCR multiplex, para determinação do LD é utilizada a observação de bandas de amplificação específicas em gel de agarose obtidas no ensaio (MAPA, 2015).

Neste trabalho foi verificado que a PCR multiplex para os genes *16S rRNA*, *hipO* e *ceuE* é capaz de detectar *Campylobacter* spp. e realizar a diferenciação entre espécies até a concentração de 10^3 UFC/mL do patógeno nas amostras avaliadas. O mesmo resultado foi encontrado por MAYR, et al. (2010), que desenvolveram uma PCR multiplex para detecção e diferenciação das espécies *C. jejuni*, *C. coli* e *C. lari* em alimentos usando os primers *mapA*, *ceuE* e *gyrA*. Entretanto, os autores utilizaram diluição em série para culturas puras, ao passo que este estudo utilizou amostras de queijo artificialmente contaminadas. O QMA pode

apresentar inibidores da PCR associados à matriz alimentar que influenciam negativamente na sensibilidade da PCR, mesmo assim o LD obtido neste estudo ainda foi coerente com estudos prévios e considerado, portanto, satisfatório.

Park et al. (2011) avaliou a diferença do limite de detecção entre PCR monoplex para a detecção de *C. jejuni* e PCR multiplex para a identificação de *C. jejuni*, *Escherichia coli* O157:H7 e *Salmonella* spp. em amostras de água. Para a monoplex foi obtido 10^1 UFC/mL e para multiplex 10^3 UFC/mL, mostrando que o monoplex foi mais sensível que a combinação de primers para a detecção de *C. jejuni*. O resultado de PARK et al. (2011) foi diferente do obtido no presente estudo, uma vez que ambas as PCRs monoplex e multiplex apresentaram o mesmo limite de detecção para a detecção de *Campylobacter* spp. em QMA.

Benetti (2014), que padronizou uma PCR em Tempo Real para detecção e quantificação de *Campylobacter* spp. em carcaças de frango, também obteve LD de 10^3 UFC/mL. Entretanto, a autora considera que esse resultado pode ser aprimorado por meio do enriquecimento das amostras em Caldo Bolton seguido pela PCR e que, assim, esta metodologia seria o mais apropriado para detectar *Campylobacter* spp. em amostras de carne de frango.

Mateo et al. (2005) avaliou a ocorrência de *Campylobacter* spp. por PCR para o gene *16S rRNA* em amostras de frango. As amostras foram artificialmente contaminadas e enriquecidas em caldo Preston. O método de PCR conseguiu detectar 5×10^1 UFC/mL do patógeno, uma carga microbiana bem menor comparado ao encontrado nesse estudo, o que corrobora a efetividade do enriquecimento na redução do limite de detecção.

Würfel et al. (2011) estudou o efeito do enriquecimento seletivo sobre PCR convencional para o gene *16S rRNA* (287 pb) na detecção de *Campylobacter* termofílicos em material avícola, como carne de frango. A detecção de amostras positivas foi três vezes maior na metodologia utilizando enriquecimento em Caldo Bolton em detrimento do método sem

enriquecimento, sugerindo que o enriquecimento é uma etapa importante para aumentar a sensibilidade da PCR.

6.2.2 Análise de restrição dos amplicons

O teste com enzimas de restrição mostrou forte evidência favorável a confirmar a identidade dos amplicons específicos de *Campylobacter* spp., *C. jejuni* e *C. coli* em amostras de QMA artificialmente contaminadas. Korolik et al. (1995) em seu trabalho avaliou a diferenciação de linhagens de *C. jejuni* e *C. coli* usando endonucleases de restrição ClaI e EcoRV. Bandas específicas foram detectadas para cada espécie, sendo que as bandas características de *C. jejuni* apareceram em todos os isolados de *C. jejuni* e estavam ausentes em todos os isolados de *C. coli*. Assim, foi possível ter uma forte evidência que os isolados eram os microrganismos de interesse, possibilitando diferencia-los entre *C. coli* e *C. jejuni*.

Foi observado neste estudo que para o gene *16S rRNA* ocorreu uma clivagem parcial, uma vez que parte do material amplificado não foi clivado e é visualizado no gel na altura de 857 pb. Esta situação pode ser facilmente resolvida aumentando o tempo de ação e/ou a concentração da enzima. Como ainda existia substrato não clivado em reação, o aumento da concentração resultaria em aumento da atividade enzimática, até que todo material amplificado fosse consumido e a banda não mais aparecesse na altura original. Além disso, o fabricante recomenda que o tempo de ação da enzima seja de 1 a 4 horas. Neste caso, para garantir a clivagem total do material genético, seria apropriado esperar o tempo máximo de 4 horas de ação da enzima.

No presente estudo, o uso de enzimas de restrição foi uma alternativa prática e rápida para a impossibilidade de realizar o sequenciamento das amostras. Vergis et al. (2013) mostraram que, sobretudo em países em desenvolvimento, onde pode existir escassez de culturas padrão, o caminho ideal para o diagnóstico seguro sobre a presença de

Campylobacter spp. seria a PCR para o gene específico, seguida de sequenciamento. Contudo, os autores desenvolveram um método alternativo, no qual após a amplificação para o gene *16S rRNA*, foi incorporada a etapa de digestão do produto de PCR com enzimas de restrição EcoRI e HindIII, em substituição ao sequenciamento. Foi visto que este método diminuiu o tempo de investigação e foi capaz de identificar importantes patógenos bacterianos entéricos, como *Campylobacter* spp..

Estes trabalhos reforçam que o uso de enzimas de restrição no presente estudo foi uma etapa importante para complementar a padronização da PCR multiplex. Foi possível confirmar que o método de extração de queijo utilizado foi eficiente na extração do DNA dos patógenos alvo e ter uma forte evidência que os microrganismos que estão sendo amplificados pela PCR multiplex padronizada é *Campylobacter* spp., *C. coli* e *C. jejuni*.

6.3 DETERMINAÇÃO DA PREVALÊNCIA DE *Campylobacter* spp. EM AMOSTRAS DE QUEIJO MINAS ARTESANAL

Essa etapa do estudo teve início com a extração de 81 amostras de QMA de campo enviadas pelo IMA. A extração foi realizada pelo método orgânico, com fenol/clorofórmio. A qualidade do DNA extraído foi avaliada por eletroforese em gel de agarose, que confirma a presença de DNA no produto da extração e expressa a efetividade do método. A eletroforese em gel de agarose é uma maneira rápida de avaliar a qualidade do DNA, além de ser possível também estimar a concentração do material genético, pela comparação com um controle que tenha concentração conhecida. Segundo a publicação da Oxford Gene Technology (2011), o DNA intacto deve aparecer no gel como uma banda compacta de alto peso molecular sem bandas individualizadas de baixo peso molecular. Este apontamento confirma a qualidade das amostras de DNA extraídas neste trabalho.

Na aplicação da metodologia padronizada neste estudo, as 81 amostras de QMA foram analisadas por PCR multiplex para detecção de *Campylobacter* spp. e diferenciação das espécies *C. jejuni* e *C. coli*. Os géis resultantes das PCRs multiplex e monoplex realizadas apresentaram divergências entre os resultados e as bandas encontradas estavam bem claras. Além disso, foi possível observar um arraste inespecífico quando as amostras foram comparadas ao controle positivo. Sendo assim, os resultados não foram conclusivos o suficiente para que fosse possível definir quais amostras eram positivas ou negativas para *Campylobacter* spp., tampouco realizar a diferenciação entre *C. jejuni* e *C. coli*.

Apesar da falta de conclusão sobre a classificação das amostras de campo analisadas para *Campylobacter* spp., a presença de bandas na altura correspondente aos patógenos alvo nos géis analisados exprime evidência a favor da positividade. Tais evidências são fortalecidas por trabalhos que encontraram alta taxa de *Campylobacter* spp. em queijos. Kobayashi et al. (2017) detectaram a presença de *Campylobacter* spp. em 18/38 (47,37%) amostras de queijos de produção informal na região metropolitana de São Paulo por PCR monoplex. Silva et al. (2008) detectaram *Campylobacter* spp. em 80% das amostras de queijo minas frescal comercializadas no município de Boicauva-MG. Estes resultados evidenciam a importância da pesquisa deste microrganismo em queijos, principalmente em QMA, uma vez que não existem trabalhos que tenham avaliado a ocorrência de *Campylobacter* spp. Nesse alimento.

Uma explicação para a inconsistência encontrada nos resultados da aplicação da PCR multiplex padronizada neste estudo poderia ser o fato das amostras potencialmente positivas apresentarem concentração de *Campylobacter* spp. abaixo do limite de detecção do método. De acordo com o que foi apresentado neste estudo, o LD está na ordem de grandeza de 10^3 UFC/mL e abaixo desta concentração o método não detecta o patógeno. Como já explorado anteriormente, uma alternativa para reverter essa condição seria o enriquecimento das

amostras em meio seletivo. Os meios de cultura mais utilizados na análise de *Campylobacter* spp. para o enriquecimento seletivo são os caldos Bolton (JOSEFSEN et al., 2004; WÜRFEL et al., 2011) e Preston (MATEO et al., 2005; MAYR et al., 2010).

Apesar de esse procedimento agregar uma etapa a mais no processo, a análise ganha em sensibilidade. Mayr et al. (2010) em seu trabalho mostraram que foi possível detectar *Campylobacter* spp. por PCR multiplex na concentração 1 a 10 UFC / 25 g de alimento após o enriquecimento. Würfel et al. (2011) estudaram o efeito do enriquecimento seletivo sobre PCR convencional para detecção de *Campylobacter* termofílicos em material avícola. Os autores identificaram amostras negativas ou fracamente positivas na PCR sem enriquecimento e que, após o enriquecimento seletivo, apresentaram resultado positivo. Esses trabalhos reforçam que o enriquecimento seletivo poderia contribuir para sanar dúvidas quanto à positividade das amostras analisadas neste estudo, uma vez que elevaria a sensibilidade do método diagnóstico. Além disso, o enriquecimento daria uma ideia da viabilidade do microrganismo na amostra, pois células não viáveis não teriam crescimento mesmo com o enriquecimento e, assim, continuariam não sendo detectadas pela PCR multiplex.

Outro ponto importante a ser considerado é a presença de inibidores da PCR inerentes a matriz e ao processo de extração, presentes na solução de DNA molde. Apesar do método de extração utilizado neste trabalho ser iniciado com a adição de tampão de lise contendo NaCl e SDS, que de acordo com Rossen et al. (1992) reduz significativamente o efeito inibitório do queijo, a amplificação do gene alvo pode ter sido inibida por algum componente, e, assim, o produto de PCR não foi detectado no gel. Este mesmo autor mostrou que os mecanismos de inibição são geralmente associados à precipitação ou desnaturação do DNA ou inativação da polimerase. Rossen et al. (1992) observaram que 0,5% de fenol e 5,0% de etanol na concentração final do mix da PCR é capaz de inibir a amplificação. Ademais, 1% de proteína inibe a reação. O autor também ressalta que a gordura precisa ser eliminada para que

os efeitos inibitórios sejam reduzidos. Considerando que fenol e etanol são reagentes utilizados na extração e que a matriz queijo tem alto teor de proteína e gordura, a extração é parte fundamental para se obter alta eficiência de amplificação e falhas nesta etapa pode comprometer o resultado da PCR.

Também é importante salientar que o método padronizado neste trabalho é para QMA do Serro e que entre as amostras estão queijos de outras regiões, como Cerrado, Canastra e Triângulo Mineiro. Sabe-se que o modo de fabricação do queijo, a microbiota endógena e a composição geral deste alimento varia de região para região. Sendo assim, é plausível considerar que amostras de regiões diferentes possam se apresentar com perfis diferentes no gel. Isso pode explicar, por exemplo, o fato de algumas amostras apresentarem arraste e outras ficarem totalmente limpas. Para futuros trabalhos, seria necessário realizar a validação completa do método em amostras de campo, de modo a melhorar a sensibilidade, e incluir testes com microrganismos diferentes de *Campylobacter* para avaliar também a especificidade da PCR multiplex. Esta etapa além de testar a especificidade do método, daria a ideia de como as amostras de QMA negativas para *Campylobacter* se apresentariam no gel e, conseqüentemente, contribuiria para resultados mais assertivos.

7. CONCLUSÃO

Os primers escolhidos para a realização deste trabalho foram eficientes para a detecção de *Campylobacter* spp., *C. jejuni* e *C. coli* por PCR monoplex, tanto para DNA das espécies de bactérias isoladas por cultivo, estando puras ou misturadas entre si, como para o DNA extraído do queijo artificialmente contaminado com as duas espécies.

Uma PCR multiplex foi padronizada para a detecção direta de *Campylobacter* spp. e diferenciação das espécies *C. jejuni* e *C. coli*. Esta mostrou ser um método rápido e efetivo na detecção dos patógenos de interesse em culturas puras e funcionou bem em amostras de QMA inoculadas experimentalmente. O limite de detecção obtido para o método foi coerente e satisfatório quando comparado com a literatura. O teste com enzimas de restrição mostrou uma forte evidência da efetividade do método padronizado nesse estudo para a detecção específica de *Campylobacter* spp., *C. jejuni* e *C. coli* em amostras de QMA. Além disso, mostrou ser uma alternativa prática e rápida para a impossibilidade de realizar o sequenciamento das amostras.

A aplicação da PCR multiplex em amostras de QMA de campo ainda não gerou resultados conclusivos, possivelmente devido a fatores tais como: i) concentração de *Campylobacter* spp. em amostras potencialmente positivas poderiam estar abaixo do limite de detecção, e/ou ii) presença de inibidores de PCR associados à matriz ou ao processo de extração que dificultaram a amplificação do material genético. Como perspectivas futuras propõe-se a inclusão de uma etapa de enriquecimento seletivo das amostras antes da extração, de maneira a elevar a sensibilidade do método, bem como a avaliação de possíveis inibidores da PCR provindos seja do QMA ou do processo de extração.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Embora o método de PCR já seja bastante difundido para a detecção de *Campylobacter* em leite cru e em alguns derivados lácteos, até o momento não existem trabalhos relacionados à detecção de *Campylobacter* em QMA por esta técnica. Sendo assim, o presente estudo foi desenvolvido visando à ampliação do número de técnicas de detecção de *Campylobacter* em QMA, por meio da padronização de um método rápido e eficiente baseado em PCR multiplex.

Para futuros trabalhos, sugere-se realizar a comparação do método molecular aqui desenvolvido com o método convencional de detecção de *Campylobacter* spp., principalmente para avaliar o limite de detecção dos métodos, uma vez que o método de cultivo para QMA não tem sensibilidade definida. Além disso, propõe-se realizar a validação completa do método em amostras de campo naturalmente contaminadas, de forma a garantir que a análise seja exata, precisa, estável e, sobretudo, reprodutível, o que irá eliminar as inconsistências encontradas na etapa de aplicação da PCR multiplex.

REFERÊNCIAS

ABUBAKAR, I.; IRVINE, L.; ALDUS, C.; WYATT, G.; FORDHAM, R.; SCHELENZ, S.; SHEPSTONE, L.; HOWE, A.; PECK, M.; HUNTER, P. A systematic review of the clinical, public health and cost-effectiveness of rapid diagnostic tests for the detection and identification of bacterial intestinal pathogens in faeces and food. **Health Technology Assessment**, v. 11, n. 36, p. 1–216, 2007.

ACHA, P. N.; SZYFRES, B. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre e a los animal. Ed. Organizacion Panamericana, 3º ed., 2001.

ADVISORY COMMITTEE ON THE MICROBIOLOGICAL SAFETY OF FOOD (ACMSF). **Second Report on *Campylobacter***. 2014.

ALMEIDA, A. C., et al. Caracterização da produção de queijo artesanal na região de Montes Claros, norte de Minas Gerais. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.6, n.4, p.312-320, 2012.

ANGELAKIS, E.; RAOULT, D. Review: Q fever. **Veterinary Microbiology**.v. 140, p. 297-309, 2010.

ANNOUS, B. A.; KOZEMPEL, M. F.; KURANTZ, M. J. Changes in Membrane Fatty Acid Composition of *Pediococcus* sp. Strain NRRL B-2354 in Response to Growth Conditions and Its Effect on Thermal Resistance. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 7, p. 2857-2862, 1999.

ARGUELLO, Y. M. S. et al. Resistance to β -lactam and tetracycline in *Campylobacter* spp. isolated from broiler slaughterhouses in southern Brazil. **Pesquisa em Veterinária Brasileira**, v. 35, n. 7, p. 637-642, 2015.

ASSEMBLEIA LEGISLATIVA DE MINAS GERAIS. Projeto de Lei nº 4.631 de 2017. Dispõe sobre a produção e a comercialização dos queijos artesanais de Minas Gerais e dá outras providências. Disponível em <https://www.almg.gov.br/atividade_parlamentar/tramitacao_projetos/interna.html?a=2017&n=4631&t=PL>. Acesso em 13 de julho de 2018.

BARACH, J. T.; ADAMS, D. M.; SPECK, M. L. Stabilization of a psychrotrophic *Pseudomonas* protease by calcium against thermal inactivation in milk at ultrahigh temperature. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 31, n. 6, p. 875-879, 1976.

BARATTO, C. M.; MEGIOLARO, F. Comparação de diferentes protocolos de extração de dna de bactérias para utilização em RAPD-PCR. **Unoesc & Ciência – ACET**, v. 3, n. 1, p. 121-130, 2012.

BECKER, K.; HARMSSEN, D.; MELLMANN, A.; MEIER, C.; SCHUMANN, P.; PETERS, G.; VON EIFF, C. Development and evaluation of a quality controlled ribosomal sequence database for 16S ribosomal DNA based identification of *Staphylococcus* species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 11, p. 4988-4995, 2004.

BENETI, G. B.; SILVA, D. L. D. Síndrome de Guillain-Barré. **Semina: Ciências Biológicas e Saúde**, Londrina, v. 27, n. 1, p. 57-69, 2006.

BENETTI, T. M. **Avaliação de métodos de detecção, quantificação e identificação de *Campylobacter* spp. em carcaças de frango resfriadas.** 2014. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos), Universidade Estadual de Londrina, Paraná, 2014.

BEISELE, M.; SHEN, Z.; PARRY, N.; MOBLEY, M.; TAYLOR, N. S.; BUCKLEY, E.; ABEDIN, M. Z.; DEWHIRST, F. E.; FOX, J. G. *Helicobacter marmotae* and novel *Helicobacter* and *Campylobacter* species isolated from the livers and intestines of prairie dogs. **Journal of Medical Microbiology**, v. 60, n. 9, p. 1366–1374, 2011.

BIANCHINIA, V.; BORELLAA, L.; BENEDETTIA, V.; PARISIB, A.; MICCOLUPOB, A.; SANTOROA, E.; RECORDATIC C.; LUINIA, M. Prevalence in Bulk Tank Milk and Epidemiology of *Campylobacter jejuni* in Dairy Herds in Northern Italy. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 6, p. 1832-1837, 2014.

BRANT, L. M. F.; FONSECA, L. M.; SILVA, M. C. C. Avaliação da qualidade microbiológica do queijo-de-minas artesanal do Serro-MG. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 6, p. 1570-1574, 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. **Decreto nº 30.691, de 29 de março de 1952.** Brasília, 1952.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Lei nº 13.680, 14 de junho de 2018.** Altera a Lei nº 1.283, de 18 de dezembro de 1950, para dispor sobre o processo de fiscalização de produtos alimentícios de origem animal produzidos de forma artesanal. Diário Oficial da União, Brasília, DF, Seção 1, p. 2, 2018.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 30, 7 agosto 2013.** Diário Oficial da União, Brasília, DF, Seção 1, p. 19, 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 57, 15 dezembro 2011.** Critérios adicionais para elaboração de queijos artesanais. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, Seção 1, p. 23, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº12, de 02 de Janeiro de 2001.** Aprova o regulamento sobre padrões microbiológicos para alimentos e seus Anexos I e II. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, Distrito Federal, n. 7, 10 Jan.2001. Seção 1, p. 45-53.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual técnico de diagnóstico laboratorial de *Campylobacter*: gênero *Campylobacter*: diagnóstico laboratorial clássico e molecular.** Brasília : Ministério da Saúde, 2011.

CALCIATI, E.; LAFUENTE, S.; DE SIMÓ, M.; BALFAGON, P.; BARTOLOMÉ, R.; CAYLÀ, J. A *Campylobacter* outbreak in a Barcelona school. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 30, n. 5, p. 243–245, 2012.

CARVALHO, A. S.; SILVA, J.; HO, P.; TEIXEIRA, P.; MALCATA, F. X.; GIBBS, P. Effects of various sugars added to growth and drying media upon thermotolerance and

survival throughout storage of freeze-dried *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. **Biotechnology Progress**, v. 20, p. 248-254, 2004.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. *Campylobacter*. 2014. Disponível em <https://www.cdc.gov/foodsafety/diseases/campylobacter/>. Acesso em 06 fev 2017.

CERVA, C.; BREMM, C.; REIS, E. M.; BEZERRA, A. V.; LOIKO, M. R.; CRUZ, C. E.; CENCI, A.; MAYER, F. Q. Food safety in raw milk production: Risk factors associated to bacterial DNA contamination. **Tropical Animal Health Production**, v. 46, n. 5, p. 877–882, 2014.

CODY, W. L.; WILSON, J. W.; HENDRIXSON, D. R.; MCIVER, K. S.; HAGMAN, K. E.; OTT, C. M.; NICKERSON, C. A.; SCHURR, M. J. Skim milk enhances the preservation of thawed -80 degrees C bacterial stocks. **Journal of Microbiological Methods**, v. 75, n. 1, p. 135-138, 2008.

CUNHA, S.D. **Aspectos físicos, químicos e microbiológicos do queijo minas artesanal de Monte Carmelo-MG**. 2016. Dissertação (mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos) – Instituto Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, 2016.

DE BOER, E. **Revision of ISO 10272 part 1 and 2: Detection and enumeration of Campylobacter**. 2009. Disponível em: http://www.sva.se/globalassets/redesign2011/pdf/om_sva/nrl/crl/workshop2009/2/revision-of-iso-10272-part-1-and-part-2-detection-and-enumeration-of-campylobacter.-enne-de-boer-wva-nl.pdf. Acesso em: 09 fev. 2017.

DE BOER, P.; RAHAOUI, H.; LEER, R. J.; MONTIJN, R. C.; VAN DER VOSSEN, J. M. B. M. Real-time PCR detection of *Campylobacter* spp.: A comparison to classic culturing and enrichment'. **Food Microbiology**, v. 51, p. 96–100, 2015.

DEBRUYNE, L.; GEVERS, D.; VANDAMME, P. Taxonomy of the Family *Campylobacteraceae*. In *Campylobacter*, 3rd ed. **American Society for Microbiology**, Washington, D.C., p. 3-26, 2008.

DEL COLLO, L. P.; KARNS, J. S.; BISWAS, D.; LOMBARD, J. E.; HALEY, B. J.; KRISTENSEN, R. C.; KOPRAL, C. A.; FOSSLER, C. P.; VAN KESSEL, J. A. S. Prevalence, antimicrobial resistance, and molecular characterization of *Campylobacter* spp. in bulk tank milk and milk filters from US dairies. **Journal Dairy Science**, v. 100, n. 5, p. 3470-3479, 2017.

DENIS, M.; SOUMET, C.; RIVAL, K.; ERMEL, G.; SALAVAT, G.; COLIN, P. Development of a mPCR assay for simultaneous identification of *Campylobacter jejuni* and *C. coli*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 29, p. 406-410, 1999.

DIAS, J.C. **Uma longa e deliciosa viagem**. São Paulo: Barleus, p. 161, 2010.

DORES, M. T.; FERREIRA, C. L. L. F. Queijo Minas Artesanal, tradição centenária: ameaças e desafios. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável**, v.2, n.2, p.26-34, 2012.

DORES, M. T.; NOBREGA, J .E; FERREIRA, C. L. L. F. Room temperature aging to guarantee microbiological safety of brazilian artisan canastra cheese. *Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 33, n. 1, 2013.

DUCH, A. A. S. **Estimativa de prevalência de *Brucella* spp. em propriedades produtoras de queijo Minas artesanal na microrregião do Serro**. 2015. Dissertação (Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados) Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2015.

EL-ADAWY, H.; HOTZEL, H.; DÜPRE, S.; TOMASO, H.; NEUBAUER, H.; HAFEZ, H. M. Determination of antimicrobial sensitivities of *Campylobacter jejuni* isolated from commercial turkey farms in Germany. *Avian Diseases Digest*, v. 7, n. 4, p. 21–22, 2012.

EL-ZAMKAN, M. A.; HAMEED, K. G. A. Prevalence of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in raw milk and some dairy products, *Veterinary World*, v. 9, n. 10, p.1147–1151, 2016.

ELKINS, K. M. **Forensic DNA Biology: A laboratory manual** – Capítulo 4. Elsevier, p. 30-52, 2013.

EMPRESA DE ASSISTÊNCIA TÉCNICA E EXTENSÃO RURAL DO ESTADO DE MINAS GERAIS – EMATER/MG. **Mapa do queijo Minas artesanal**. 2014. Disponível em: <http://www.emater.mg.gov.br/portal.cgi?flagweb=site_pgn_downloads_vert&grupo=135&menu=59> . Acesso em: 23 jan. 2017.

FARIA, L.S. **Prevalência e fatores de risco para *Coxiella burnetii* em queijos minas artesanais da microrregião do Serro**. 2017. Pós-graduação em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2017.

FEITOSA, T.; BORGES, M.F.; NASSU, R.T. et al. Pesquisa de *Salmonella* sp., *Listeria* sp. e microrganismos indicadores higiênico-sanitários em queijos produzidos no Estado do Rio Grande do Norte. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 23, p. 162- 165, 2003.

FERMÉR C; ENGVALL, E. O. Specific PCR identification and differentiation of the thermophilic *Campylobacters*, *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, and *C. upsaliensis*. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 37, p. 3370-3373, 1999.

FREDRIGO, R.C., et al. Caracterização de estirpes de *Campylobacter coli* isoladas de carcaças de ovinos e de efluentes de abatedouro do estado de São Paulo. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 68, n. 1, p. 29-38, 2016.

GE HEALTHCARE. **Nucleic Acid Sample Preparation for Downstream Analyses - Principles and Methods**. Tokyo, p. 50, 2007.

GHARST, G., OYARZABAL, O.A., HUSSAIN, S.K. Review of current methodologies to isolate and identify *Campylobacter* spp. from foods. *Journal of Microbiology Methods*, v. 95, n. 1, p. 84–92, 2013.

GOLDMAN, C. G.; MATTEO, M. J.; LOUREIRO, J. D.; ALMUZARA, M.; BARBERIS, C.; VAY, C.; CATALANO, M.; HEREDIA, S. R.; MANTERO, P.; BOCCIO, J. R.; ZUBILLAGA, M. B.; CREMASCHI, G. A.; SOLNICK, J. V.; PEREZ-PEREZ, G. I.; BLASER, M. J. Novel gastric helicobacters and oral *Campylobacter* are present in captive and wild cetaceans. **Veterinary Microbiology**, v. 152, n. 1 e 2, p. 138–145, 2011.

GONZALEZ, I., et al. Specific identification of the enteropathogenic *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by using a PCR test based on the *ceuE* gene encoding a putative virulence determinant. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, p. 759-763, 1997.

GUO, B.L.; PRINZ, M.; STAAK, M. Influence of Agarose Concentration and Electric Field Strength on the Separation of DNA-Fragments During Electrophoresis. **Advances in Forensic Haemogenetics**, v. 4, Springer, Berlin, 1992.

HANI, E. K.; CHAN, V. L. Expression and characterization of *Campylobacter jejuni* benzoylglycine amidohydrolase (hippuricase) gene in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 177, p. 2396-2402, 1995.

HENEGARIU, O., et al. Multiplex PCR: Critical Parameters and Step-by-Step Protocol. **BioTechniques**, v. 23, n. 3, p. 504-511, 1997.

HUNGARO, H. M., et al. Low contamination of *Campylobacter* spp. on chicken carcasses in Minas Gerais state, Brazil: Molecular characterization and antimicrobial resistance. **Food Control**, v. 51, p. 15-22, 2015.

HUNT, J.M., ABEYTA, C., TRAN, T. BAM: *Campylobacter*. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm072616.htm>>. Acesso em 17 de julho de 2018.

HUQ, M.; GONIS, G.; ISTIVAN, T. Development and evaluation of a Multiplex PCR for the detection of *Campylobacter concisus* and other *Campylobacter* spp. from gastroenteritis cases. **Open Journal of Medical Microbiology**, v. 4, n. 1, p. 29–37, 2014.

HUSSAIN, I.; MAHMOODA, M. S.; AKHTARB, M.; KHAN, A. Prevalence of *Campylobacter* species in meat, milk and other food commodities in Pakistan. **Food Microbiology**, v. 24, p. 219–222, 2007.

JOSEFSEN, M. H.; JACOBSEN, N. R.; HOORFAR, J. Enrichment Followed by Quantitative PCR both for Rapid Detection and as a Tool for Quantitative Risk Assessment of Food-Borne Thermotolerant *Campylobacters*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, p. 3588–3592, 2004.

KAAKOUSH N. O.; CASTANO-RODRIGUEZ N.; MITCHELL H. M.; MAN, S. I. M. Global epidemiology of *Campylobacter* Infection. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 28, p. 687–720, 2015.

KASVI. **História e evolução da técnica de PCR**. 2015. Disponível em: <http://kasvi.com.br/historia-e-evolucao-da-tecnica-de-pcr/>. Acesso em 09 de julho de 2018.

KHANNA, M. R; BHAVSAR, S. P; KAPADNIS, B. P. Effect of temperature on growth and chemotactic behaviour of *Campylobacter jejuni*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 43, p. 84-90, 2006.

KOBAYASHI, P. F.; CARVALHO, A. F.; FREDRIGO, R. C.; COSTA, A. M.; PIATTI, R. M.; PINHEIRO, E. S. Detection of *Brucella* spp., *Campylobacter* spp. and *Listeria monocytogenes* in raw milk and cheese of uninspected production in the metropolitan area of São Paulo. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 38, n. 4, p. 1897-1904, 2017.

KOROLIK, V.; MOORTHY, L.; COLOE, P. J. Differentiation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* strains by using restriction endonuclease DNA profiles and DNA fragment polymorphisms. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 5, p. 1136–1140, 1995.

LAKE, R.; HUDSON, A.; CRESSEY, P.; GILBERT, S. **Risk profile: Campylobacter jejuni/coli in red meat.** 2007. Disponível em: http://www.elika.eus/datos/articulos/Archivo226/NZFSA_CampjejuniCarneRoja07.pdf. Acesso em: 09 fev. de 2017.

LEAL, A.; BORGES, M. C. Patrimônio Cultural Imaterial: Leis e Documentos. [Online]. In Revista Caminhos de Geografia. Universidade Federal de Uberlândia - Instituto de Geografia, vol. 13, nº 44. p. 221–234, 2012.

LORENZ, T. C. Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. **Journal of Visualized Experiments**, v. 63, p. 1-15, 2012.

MAN, S. M. The clinical importance of emerging *Campylobacter* species. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 8, p. 669–685, 2011.

MATA, G. M. S. C. **Comparação de métodos para pesquisa de *Salmonella* sp. e *Listeria* sp. e avaliação microbiana e físico-química em queijo minas artesanal.** [Dissertação] Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2009.

MATEO, E.; CÁRCAMO, J.; URQUIJO, M.; PERALES, I.; ASTORGA, A. F. Evaluation of a PCR assay for the detection and identification of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in retail poultry products. **Research in Microbiology**, v. 156, p. 568–574, 2005.

MAYR, A. M., et al. Rapid detection and differentiation of *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, and *Campylobacter lari* in food, using multiplex real-time PCR. **Journal of Food Protection**, v. 73, n. 2, p. 241–250, 2010.

MINAS GERAIS. ASSEMBLÉIA LEGISLATIVA DO ESTADO DE MINAS GERAIS. **Lei nº 14.185, de 31 de janeiro de 2002.** Dispõe sobre o processo de produção do queijo Minas artesanal e dá outras providências. Diário do Executivo. Minas Gerais, Belo Horizonte, 1 fev. 2002b. p. 3 col. 2. Disponível em: <<http://www.almg.gov.br>>. Acesso em: 23 jan. 2017.

MINAS GERAIS. ASSEMBLÉIA LEGISLATIVA DO ESTADO DE MINAS GERAIS. **Lei nº 19.492, de 13 de janeiro de 2011.** Altera dispositivos da Lei nº 14.185, de 31 de janeiro de 2002, que dispõe sobre o processo de produção do Queijo Minas Artesanal e dá outras

providências. Diário do Executivo. Minas Gerais, Belo Horizonte. Disponível em: <<https://www.legisweb.com.br/legislacao/?id=142617>>. Acesso em: 23 jun. 2018.

MINAS GERAIS. ASSEMBLÉIA LEGISLATIVA DO ESTADO DE MINAS GERAIS. **Lei nº 20.549, 18 dezembro 2012.** Dispõe sobre a produção e a comercialização dos queijos artesanais de Minas Gerais. Diário do Executivo. Minas Gerais, Belo Horizonte, 19 dez. 2012. p. 1 col. 2. Disponível em: <<http://www.almg.gov.br/>>. Acesso em: 01 fev. 2018.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). **Manual de Verificação de Desempenho de Métodos para Diagnóstico Molecular de Doenças Infeciosas na Rede Nacional de Laboratórios Agropecuários.** Brasília, 2015.

MODI, S.; BRAHMBHATT, M. N.; CHATUR, Y. A.; NAYAK, J. B. Prevalence of *Campylobacter* species in milk and milk products, their virulence gene profile and anti-bio gram. **Veterinary World**, v. 8, n.1, p. 1–8, 2015.

MONTEIRO, G. P. **Viabilidade e expressão de transcritos de virulência em *Campylobacter jejuni* experimentalmente inoculados em queijos minas artesanal.** 2013. Pós-graduação em Ciências Veterinárias (Saúde Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2013.

MUNGAI, E. A.; BEHRAVESH, C. B.; GOULD, L. H. Increased outbreaks associated with Nonpasteurized milk, United States, 2007–2012. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 1, p. 119–122, 2015.

MURALIDHARAN, M. et al. Identification of Genus *Campylobacter* up to Species Level Using Internal Features of 16S rRNA Gene Sequences. **Molecular Genetics, Microbiology and Virology**, v. 31, n. 3, p. 187–196, 2016.

NACHAMKIN, I. *Campylobacter jejuni*. In: DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L. R. **Food Microbiology: fundamental and frontiers.** 3.ed. Washinton: ASM Press, p.237-248, 2007.

NARCIZO, D. K.; MONTANHINI, M. T. M. Ocorrência de *Campylobacter jejuni* em leite cru e pasteurizado comercializado em Curitiba, Estado do Paraná, Brasil. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 69, n. 5, p. 341-347, 2014.

NGUYEN, H. T. T; CORRY, J. E. L.; MILES, C. A. Heat resistance and mechanism of heat inactivation in thermophilic *Campylobacters*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, p. 908-913, 2006.

ORNELAS, E.A. **Diagnostico preliminar para caracterização do processo e das condições de fabricação do queijo artesanal da Serra da Canastra.** 2005. Mestrado (Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2005.

OYARZABAL, O. A., BATTIE, C. **Immunological methods for the detection of *Campylobacter* spp.— current applications and potential use in biosensors.** In: Abuelzein, E. (Ed.), Trends in Immunolabelled and Related Techniques. InTech, Rijeka, Croatia, p. 203–226, 2012.

OXFORD GENE TECHNOLOGY. **Understanding and measuring variations in DNA sample quality.** 2011. Disponível em <https://www.ogt.com/resources/literature/483_understanding_and_measuring_variations_in_dna_sample_quality>. Acesso em 30 de julho de 2018.

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

PARK, S. H., et al. Multiplex PCR assay for the detection and quantification of *Campylobacter* spp., *Escherichia coli* O157:H7, and *Salmonella* serotypes in water samples. **FEMS Microbiology Letters**, v. 316, p. 7–15, 2011.

RAHIMI, E.; SEPEHRI, S.; MOMTAZ, H. Prevalence of *Campylobacter* species in milk and dairy products in Iran. **Revue de Medecine Veterinaire**, v, 164, n. 5, p. 283 – 288, 2013.

REZENDE, P. H. L.; MENDONÇA, E. P.; MELO, R. T.; COELHO R. L., et al. Aspectos sanitários do queijo minas artesanal comercializado em feiras livres. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 65, n. 377, p. 36-42, 2010.

ROSA, D. D. Método rápido de extração de DNA de bactérias. **Summa Phytopathologica**, v. 34, n. 3, p. 259-261, 2008.

ROSSEN, L.; NORSKOV, P.; HOIMSTROM, K.; RASMUSSEN, O. F. Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions. **International Journal of Microbiology**, v. 17, p. 37 – 45, 1992.

RUDI, K.; HOIDAL, H. K.; KATLA, T.; JOHANSEN, B. K.; NORDAL, J.; JAKOBSEN, K. S. Direct real-time PCR quantification of *Campylobacter jejuni* in chicken fecal and cecal samples by integrated cell concentration and DNA purification. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 2, p. 790–797, 2004.

RUDI, K.; MOEN, B.; DROMTORP, S. M.; HOLCK, A. L. Use of Ethidium Monoazide and PCR in combination for quantification of viable and dead cells in complex samples. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 2, p. 1018–1024, 2005.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2. Ed.. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, v. 1, 1989.

SCHRADER, C.; SCHIELKE, A.; ELLERBROEK, L.; JOHNE, R. PCR inhibitors – occurrence, properties and removal. **Journal of Applied Microbiology**, v.113, p. 1014-1026, 2012.

SCHUSTER, C. J.; ELLIS, A. G.; ROBERTSON, W. J.; CHARRON, D. F.; ARAMINI, J. J.; MARSHALL, B. J.; MEDEIROS, D. T. Infectious disease outbreaks related to drinking water in Canada. **Canadian Journal of Public Health**, v. 96, p. 254–258, 2005.

SEINIGE, D.; KRISCHEK, C.; KLEIN, G.; KEHRENBERG, C. Comparative analysis and limitations of Ethidium Monoazide and Propidium Monoazide treatments for the differentiation of viable and Nonviable *Campylobacter* cells. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 7, p. 2186–2192, 2014.

- SILVA, C. M.; COSTA, S. O.; RAMOS, D. M. B.; MENDONÇA, R. C. S.; SOUZA, N. L. **Ocorrência de *Campylobacter* spp. em queijo tipo “Minas frescal” comercializados no município de Bocaiúva - MG.** In: ENCONTRO NORTE-MINEIRO DE BIÓLOGOS, Belo Horizonte: Conselho Regional de Biologia – 4ª Região, p. 147, 2008.
- SILVA, M. R. Doenças transmitidas pelo leite e sua importância em saúde pública. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 62, p. 3 – 18, 2007.
- SILVA, M. R. **Investigação epidemiológica de um surto de infecção alimentar por *Campylobacter jejuni* associado ao consumo de leite cru.** Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2003. [Monografia: Especialização em Nutrição Humana e Saúde].
- SILVA, M. R.; ROCHA, A. S.; COSTA, R. R.; ALENCAR, A. P., *et.al.* Tuberculosis patients co-infected with *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis* in na urban area of Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, p. 321-7, 2013.
- SILVA, O. G., *et al.* Detecção de fatores de virulência em estirpes de *Campylobacter* spp. isoladas de carcaças de suínos abatidos em frigoríficos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecologia**, v. 64, n. 5, p. 1209-1215, 2012.
- SILVA, W. C.; TARGINO, B. N.; MENDONÇA, R. S.; SANT’ANA, A. S.; HUNGARO, H. M. *Campylobacter*: An overview of cases, occurrence in food, contamination sources, and antimicrobial resistance in Brazil. **Food Reviews International**, v. 34, n. 4, p. 364-389, 2017.
- SILVA, W. C.; TARGINO, B. N.; GONÇALVES, A. G.; SILVA, M. R.; HUNGARO, H. M. **Campylobacter: an important food safety issue.** Capítulo 13. In: Food Safety and Preservation. 2018.
- SINGH, H.; RATHORE, R. S.; SINGH, S.; CHEEMA, P. S. Comparative analysis of cultural isolation and PCR based assay for detection of *Campylobacter jejuni* in food and faecal samples. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, p. 181-186, 2011.
- SOARES, D.B. **Caracterização físico-química e microbiológica do queijo minas artesanal produzido em Uberlândia-MG.** 2014. Dissertação (mestrado em Ciências Veterinárias – produção animal) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2014.
- VERGIS, J.; NEGI, M.; POHARKAR, K.; DAS, D. P.; MALIK, S. V. S.; KUMAR, A.; DOIJAD, S. P.; BARBUDDHE, S. B.; RAWOOL, D. B. 16S rRNA PCR followed by restriction endonuclease digestion: A rapid approach for genus level identification of important enteric bacterial pathogens. **Journal of Microbiological Methods**, v. 95, p. 353–356, 2013.
- VIEIRA, D. P. **Técnicas de PCR: Aplicações e Padronização de Reações.** Laboratório de Biologia Molecular-IPEN, 2002. Disponível em <http://www.imt.usp.br/wp-content/uploads/proto/protocolos/aula1.pdf>. Acesso em 09 de julho de 2018.

ZAFFARI, C. B., MELLO, J. F., COSTA, M. da. Qualidade bacteriológica de queijos artesanais comercializados em estradas do litoral norte do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 3, p. 862-867, 2007.

ZHAO, G.; ZHANG, G. Effect of protective agents, freezing temperature, rehydration media on viability of malolactic bacteria subjected to freeze-drying. **Journal of Applied Microbiology**, v. 99, n. 2, p. 333-338, 2005.

YOUNG, K. T.; DAVIS, L. M.; DIRITA, V. J. *Campylobacter jejuni*: molecular biology and pathogenesis. **Nature Reviews – Microbiology**, v. 35, p. 665 - 679, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Campylobacter**. 2016. Disponível em <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs255/en/>. Acesso em 06 fev 2017.

WOOD, R. C.; MACDONALD, K. L.; OSTERHOLM, M. T. Campylobacter enteritis outbreaks associated with drinking raw milk during youth activities. A 10-year review of outbreaks in the United States. **Journal of American Medical Association**, v. 268, p. 3228-3230, 1992.

WÜRFEL, S. F. R., et al. **Efeito do enriquecimento seletivo de amostras sobre a PCR para detecção de *Campylobacter* termófilos em material avícola**. EMBRAPA Suínos e Aves, 2011.