

Efeito do enriquecimento seletivo de amostras sobre a PCR para detecção de
Campylobacter termófilos em material avícola

Effect of selective enrichment on PCR detection of thermophilic *Campylobacter* in
poultry

Simone de Fátima Rauber Würfel¹, Jenifer dos Santos Pozza², Clarissa Silveira Luiz
Vaz^{3*}, Daiane Voss-Rech⁴

Resumo

O objetivo desse trabalho foi avaliar a influencia do enriquecimento seletivo em amostras de material avícola sobre o resultado da PCR para detecção de *Campylobacter* termófilos. Foram analisados fezes, suabes de arrasto e camas coletados em granjas comerciais positivas para *Campylobacter*, que foram submetidos à PCR com e sem enriquecimento seletivo em Caldo Bolton a 41,5°C sob microaerofilia por 48 hs. Foram identificadas amostras negativas ou fracamente positivas na PCR sem enriquecimento, mas que foram positivas após o enriquecimento seletivo, indicando que o enriquecimento em Caldo Bolton por 48 hs é necessário para manter o nível de sensibilidade do ensaio de PCR utilizado.

Palavras-chave: *Campylobacter*, frango de corte, PCR

Summary

The aim of this study was access the effect of selective enrichment on PCR detection of thermophilic *Campylobacter* in poultry samples. Drag swabs, poultry feces and poultry litter samples were collected in poultry farms previously positive for *Campylobacter*. PCR analysis was performed in samples with or without selective enrichment in Bolton Broth for 48 h. Samples without selective enrichment were negative or weakly positive at PCR analysis, while they were PCR positive after selective enrichment in Bolton

¹Aluna de graduação em Medicina Veterinária e estagiária curricular da Embrapa Suínos e Aves, Universidade Federal de Pelotas, RS; ²Aluna de graduação em Ciências Biológicas, Universidade do Contestado, Concórdia, SC; ^{3*}Médica Veterinária, Dr., Embrapa Suínos e Aves, Concórdia, SC; ⁴Bióloga, Embrapa Suínos e Aves, Concórdia, SC.*Autor para correspondência (Embrapa Suínos e Aves, Caixa Postal 21, 89700-000, Concórdia, SC, clarissa@cnpsa.embrapa.br)

Broth. The present study suggests that PCR preceded by enrichment in Bolton Broth for 48 h allows more reliable molecular results.

Key words: *Campylobacter*, poultry, PCR

Campylobacter termófilos (*C. jejuni*, *C. coli* e *C. lari*) não causam doença clínica em frangos, porém podem contaminar a carne durante o abate e representar risco ao consumidor se manipulada ou ingerida inadequadamente. A detecção microbiológica de *Campylobacter* envolve etapas de enriquecimento por 48 hs, isolamento em meios seletivos por 24-48 hs e subcultivo em meios não seletivos para confirmação dos isolados (ISO 10727-1:2006). Uma alternativa diagnóstica mais rápida seria o uso de PCR. O objetivo deste trabalho foi avaliar o resultado da PCR para detecção de *Campylobacter* termófilos a partir da aplicação direta à amostra ou após enriquecimento em caldo seletivo. Foram amostrados frangos de corte com 4 semanas de idade, procedentes de 4 aviários de granjas comerciais no Sul do Brasil, previamente positivos para *Campylobacter*. De cada aviário foram coletados 2 *pool* de fezes, 2 suabes de arrasto e 2 *pool* da cama em 3 partes de Caldo Bolton (CB). O material foi homogeneizado e foram coletadas alíquotas de 0,5 mL do caldo de transporte de cada amostra para análise por PCR. O restante de cada amostra foi enriquecido em 9 partes de CB acrescido de antimicrobianos (ISO 10727-1:2006) a 41,5°C por 48 hs, sob microaerofilia e foram novamente coletadas alíquotas de 0,5 mL de cada amostra para a PCR. A extração de DNA foi realizada conforme previamente descrito (BOOM et al., 1990), incluindo cepas padrão de *C. jejuni* (controle positivo), *C. fetus venerealis* e CB (controles negativos). A PCR foi realizada utilizando *primers* e condições previamente descritos (JOSEFSEN et al., 2004) para amplificação de uma sequência de 287 pares de bases (pb) do RNAr 16S de *C. jejuni*, *C. coli* e *C. lari*. O resultado foi visualizado após eletroforese em gel de agarose corado por EtBr. Como resultados, houve maior número de positivos na PCR das amostras de fezes (6/8), suabes de arrasto (6/8) e cama (3/8) enriquecidas em CB por 48 hs do que na PCR dessas mesmas amostras de fezes (2/8), suabes de arrasto (2/8) e cama (0/8) sem enriquecimento. A observação de amostras negativas ou fracamente positivas na PCR sem enriquecimento e que foram positivas após o enriquecimento seletivo (Figura 1), sugere que o enriquecimento é necessário para diminuir a perda de sensibilidade da PCR. Segundo Alves et al. (2011), o limite de detecção desse ensaio de PCR a partir de amostras enriquecidas em CB foi de 71 UFC/mL, e favoreceu a detecção de células viáveis de *Campylobacter*. Como

conclusão, este ensaio de PCR é recomendado a partir de amostras previamente enriquecidas em Caldo Bolton.

Figura 1: Detecção do produto de 287 pb do RNAr 16S de *Campylobacter* termófilos em amostras enriquecidas e não enriquecidas.

Legenda: 1: marcador de tamanho molecular (*Ladder* 100 pb); 2: controle positivo (*C. jejuni* em CB); a (sem enriquecimento); b (após enriquecimento); 3-4: amostras de fezes; 5-6: amostras de suabes de arrasto; 7: controle negativo (CB); 8: controle negativo (*C. fetus venerealis*).

Referências Bibliográficas

ALVES, L. et al. Detecção por PCR de *Campylobacter* termófilos em materiais de frangos de corte obtidos em frigorífico. In: CONFERÊNCIA FACTA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLA, 2011, Santos. **Resumos...** Santos:FACTA, 2011. SA13.

BOOM, R.; SOL, C.J.A.; SALIMANS, M.M.M. et al. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **Journal of Clinical Microbiology**, v.28, p.495-503, 1990.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for detection and enumeration of thermotolerant *Campylobacter* spp. – Part 1: detection method. ISO 10727-1:2006 [E].

JOSEFSEN, M.H., LÜBECK, P.S., HANSEN, F. et al. Towards an international standard for PCR-based detection of foodborne thermotolerant *Campylobacter*s: interaction of enrichment media and pre-PCR treatment on carcass rinse samples. **Journal of Microbiological Methods**, v.58, p.39-48, 2004.