

DETECÇÃO POR PCR DE *Campylobacter* TERMÓFILOS EM MATERIAIS DE FRANGOS DE CORTE OBTIDOS EM FRIGORÍFICO

L Alves^{1,2}, D Voss-Rech⁴, J Pozza^{1,3}, VS Silva⁴, CSL Vaz^{4*}

¹Universidade do Contestado – UnC. Campus Concórdia.

²Bolsista ITI/CNPq.

³Bolsista PIBIC/CNPq.

⁴Embrapa Suínos e Aves. Concórdia, SC, Brasil.

Introdução

Campylobacter é uma das principais bactérias causadoras de gastroenterite em humanos. Estão presentes naturalmente no trato gastrointestinal de aves e outros animais de produção e cavidade oral de humanos. Dentre as espécies mais conhecidas estão os termófilos: *C. coli*, *C. jejuni* e *C. lari*, que vêm recebendo atenção devido à sua importância na segurança dos alimentos (1). Existem trabalhos sobre sua prevalência em granjas e abatedouros de frangos de corte baseados no diagnóstico bacteriológico (2). O objetivo deste estudo foi verificar a ocorrência de *Campylobacter* termófilos na linha de abate de um frigorífico através da reação em cadeia da polimerase (PCR) como método alternativo ao isolamento microbiológico.

Material e Métodos

Foram coletados 32 suabes de cloaca durante a pendura das aves, 33 cecos e 31 carcaças após o gotejamento, oriundos de um lote de frangos de corte abatido sob Inspeção Federal no mesmo turno em um frigorífico da região Sul do Brasil. O material foi enriquecido em Caldo Bolton (CB) na proporção de 1:10, sob microaerofilia, a 41,5°C por 48h (3) quando foram coletadas alíquotas para a extração de DNA pelos métodos de sílica diatomácea (1) e tiocianato de guanidina (4). A concentração e pureza dos DNAs obtidos foi determinada pela leitura da densidade óptica, em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 260nm e razão 260/280nm, respectivamente. A sensibilidade da PCR foi determinada a partir de um cultivo padrão de *C. jejuni* em CB, quantificado pelo método de diluição seriada na base 10 e plaqueado em Ágar Campy-Line em duplicata. Alíquotas de cada diluição foram submetidas a extração de DNA pelos dois métodos avaliados e posterior PCR. A determinação da especificidade da PCR foi realizada a partir da extração de DNA e PCR de cultivos ATCC das espécies de interesse e outras relacionadas (*C. jejuni* subsp. *jejuni*, *C. jejuni* subsp. *doylei*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis*, *C. fetus venerealis*, *Arcobacter butzleri*, *A. skirrowii* e *S. Enteritidis*). A inibição da PCR por material fecal presente nas amostras foi testada a partir de 1g de fezes de galinhas livres de *Campylobacter*, diluídas em PBS pH 7,4 nas proporções de 1:4 e 1:40. De cada diluição, 1mL foi transferido para 9mL de CB contaminado com uma alçada de *C. jejuni* subsp. *jejuni* (ATCC 33560) e incubadas sob microaerofilia a 41,5°C/48h quando o DNA foi extraído por ambos os métodos. A PCR foi utilizada para amplificar uma região do gene RNAr 16S com um tamanho de 287 pb presente em *C. coli*, *C. jejuni* e *C. lari*, conforme previamente descrito (5). Os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose 1,5% corado por brometo de etídio (0,5 µg/mL). O resultado da PCR foi confirmado pelo sequenciamento de DNA no ABI 3130 *Genetic Analyzer* a partir da purificação do produto amplificado utilizando o kit GFX PCR Purification e marcado com *BigDye Terminator* v3.1 *Cycle Sequencing*. Os dados foram coletados com o software Data Collection v1.0.1 e as sequências de

nucleotídeos obtidas foram comparadas com o GenBank utilizando o *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST).

Resultados e Discussão

A concentração e a pureza do DNA obtido pelos métodos de extração avaliados foram equivalentes, porém, o limite de detecção a partir do protocolo de sílica foi menor (71 UFC/mL) que o obtido pelo de guanidina (7100 UFC/mL), sendo o DNA obtido pelo método de sílica utilizado para a PCR. A PCR utilizada amplificou as três espécies de interesse (*C. coli*, *C. jejuni* e *C. lari*) e também outras espécies de *Campylobacter* (*C. upsaliensis* e *C. fetus venerealis*) e outros gêneros de bactérias (*A. skirrowii* e *A. butzleri*), o que pode ter ocorrido pela proximidade da sequência de nucleotídeos. Porém, essas espécies não são tipicamente isoladas de aves, o que não invalida a PCR. O resultado da PCR não foi influenciado pela presença de material fecal no momento da extração de DNA, demonstrando não haver inibição do ensaio por fezes de aves. A PCR amplificou cerca de 95,8% das amostras coletadas no frigorífico (Tabela 1).

Tabela 1 – Resultado obtido pela PCR

Material (nº de amostras)	Positivos	Negativos
Suabe de Cloaca (32)	29	3
Conteúdo Cecal (33)	32	1
Carcaça (31)	31	0

Através do sequenciamento de DNA foi possível obter sequências de 222pb com 99% de similaridade com *Campylobacter jejuni*, *coli* e *lari*.

Conclusão

Foi identificada a presença de DNA de *Campylobacter* termófilos através da PCR em 95,8% das amostras analisadas. O método de extração de DNA por sílica foi o mais eficiente. A PCR utilizada pode ser aplicável para a detecção de *Campylobacter* termófilos em aves.

Bibliografia

1. Lawson AJ, Linton D, Stanley RJ. *Journal of Applied Microbiology* 1997; 83:375-380.
2. Chaves SOC. 2007. f. 80. Dissertação - Curso de Mestrado em Ciência Animal. UFPA, Belém-PA.
3. International Organization for Standardization. 10272- 1. 2006
4. Pitcher DG, Saunders NA, Owen RJ. *Letters Applied Microbiology* 1989; 8:151-15.
5. Josefsen MH *et al.* *Journal of Microbiological Methods* 2004; 58:39-48.