

IDENTIFICAÇÃO GENOTÍPICA DE *Campylobacter* TERMÓFILOS ISOLADOS DE FRANGOS RESFRIADOS COMERCIALIZADOS NO SUL DO RIO GRANDE DO SUL

SIMONE DE FÁTIMA RAUBER WÜRFEL¹; CRISTIANE VANIEL²; JANAÍNA SCHNEIDER E SILVA³; LOUISE HAUBERT⁴; MAURICÉIA GREICI DE OLIVEIRA⁵; WLADIMIR PADILHA DA SILVA⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – simone_rauber@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – cristianevaniel@yahoo.com.br

³Universidade Federal de Pelotas – janaina.255@hotmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – louisehaubert@hotmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – greici@jc.iffarroupilha.edu.br

⁶Universidade Federal de Pelotas – wladimir.padilha2011@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Campylobacter spp. é considerada a causa mais comum de gastroenterite bacteriana de origem alimentar em todo o mundo e a incidência das infecções em humanos tem aumentado constantemente há vários anos em quase todos os países desenvolvidos (WHO, 2011). No Brasil, os casos de campilobacteriose são subdiagnosticados e subnotificados, além do difícil acesso a dados epidemiológicos (ALVES; OLIVEIRA, 2013). Isso se deve, principalmente, a escassez de laboratórios que desenvolvem estudos com *Campylobacter* spp. e, por consequência, existem poucos dados sobre isolamento e caracterização do patógeno no país (FILGUEIRAS, 2012).

A maioria dos casos de infecção por *Campylobacter* spp. em humanos é associada ao consumo de carne de aves crua ou mal cozida, ou pela contaminação cruzada para alimentos consumidos *in natura* (CDC, 2014). O grupo denominado termofílico contempla a maioria das espécies patogênicas para o homem. Dentre elas, *C. jejuni* e *C. coli* são as de maior importância em saúde pública, sendo *C. jejuni* a espécie mais envolvida em infecções em humanos e também, mais prevalente em aves (HUMPHREY et al., 2007).

Segundo PARK (2002), grande parte da população de aves do mundo está contaminada com *Campylobacter* spp., refletindo em altos índices de isolamento em seus produtos comercializados em supermercados. Entretanto, apesar da sua importância como agente causador de doença de origem alimentar, há poucas informações sobre os níveis de contaminação em alimentos de origem avícola comercializados no Brasil (GRITTI et al., 2011).

Por serem micro-organismos de difícil cultivo, isolamento e identificação, métodos alternativos, como os ensaios moleculares, têm sido amplamente utilizados. Entretanto, para garantir uma identificação correta de *Campylobacter* spp., muitas vezes é necessária uma combinação de marcadores fenotípicos e moleculares (WHO, 2013).

Nesse contexto, é de fundamental importância que sejam desenvolvidos estudos relacionados à detecção de *Campylobacter* spp. em alimentos de origem avícola, associando a metodologia convencional às técnicas moleculares, a fim de garantir a identificação precisa desses micro-organismos. Assim, o objetivo deste estudo foi identificar genotipicamente *Campylobacter* termófilos isolados de frangos resfriados comercializados no sul do Rio Grande do Sul.

2. METODOLOGIA

Foram analisados 129 isolados de *Campylobacter* termófilos, previamente identificados através de métodos fenotípicos como *C. jejuni* (119/129) e *C. coli* (10/129), oriundos de amostras de frangos resfriados comercializados no sul do Rio Grande do Sul.

A confirmação molecular dos isolados foi realizada através da *Polymerase Chain Reaction* (PCR), utilizando *primers* e condições previamente descritos (JOSEFSEN et al., 2004), com objetivo de amplificar uma sequência de 287 pares de bases (pb) do gene 16S rRNA de *C. jejuni*, *C. coli* e *C. lari*. Para a diferenciação entre as espécies *C. jejuni* e *C. coli*, utilizou-se o protocolo de Multiplex PCR (mPCR) adaptado de MACKIW et al. (2012), obtendo-se um produto de 773pb para *C. jejuni* e 364pb para *C. coli*. Os *primers* utilizados nas reações estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1 - *Primers* utilizados para confirmação molecular e diferenciação de espécies termófilas de *Campylobacter*.

<i>Primer</i>	Espécie alvo	Sequência (5' → 3')	Produto (pb)	Referência
OT1559(F)	<i>C. jejuni</i>	CTGCTTAACACAAGTTGAGTAGG	287	JOSEFSEN et al. (2004)
18-1(R)	<i>C. coli</i>	TTCCTTAGGTACCGTCAGAA		
Cc(F)	<i>C. coli</i>	AGGCAAGGGAGCCTTTAATC	364	MACKIW et al. (2012)
Cc(R)		TATCCCTATCTACAAATTTCGC		
Cj(F)	<i>C. jejuni</i>	CATCTTCCCTAGTCAAGCCT	773	MACKIW et al. (2012)
Cj(R)		AAGATATGGCACTAGCAAGAC		

F = forward; R = reverse.

Utilizou-se o DNA das cepas de referência *C. jejuni* ATCC 33291, *C. coli* CAMPY 1003, *C. lari* NCTC 11352 e *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 como controles positivo e negativo, além de água ultrapura para controle da reação. Os produtos amplificados foram separados através de eletroforese em gel de agarose 1,5% e visualizados em fotodocumentador.

Para verificar se existiam diferenças significativas entre as espécies de *Campylobacter* identificadas genotipicamente, foi realizada uma análise de variância (ANOVA), seguida do teste de Fisher ao nível de significância de 5%, utilizando o *software* Statistica 7.0 (StartSoft, Inc. 1984-2004).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os isolados (n=129) foram confirmados como *Campylobacter* spp., sendo pertencentes ao grupo termofílico devido à amplificação de um fragmento de 287pb do gene 16S rRNA de *C. jejuni*, *C. coli* e *C. lari*.

A partir da mPCR, foi possível identificar 92,25% (119/129) dos isolados como *C. jejuni* e 9,30% (12/129) dos isolados como *C. coli*. Esse resultado difere do encontrado na identificação fenotípica devido à detecção de cultura mista, ou seja, presença simultânea de *C. jejuni* e *C. coli*, em dois isolados.

Verificou-se que houve diferença significativa entre as espécies de *Campylobacter* identificadas ($p < 0,05$), sendo *C. jejuni* significativamente mais detectada que *C. coli* através dos testes genotípicos ($p < 0,05$, Figura 1).

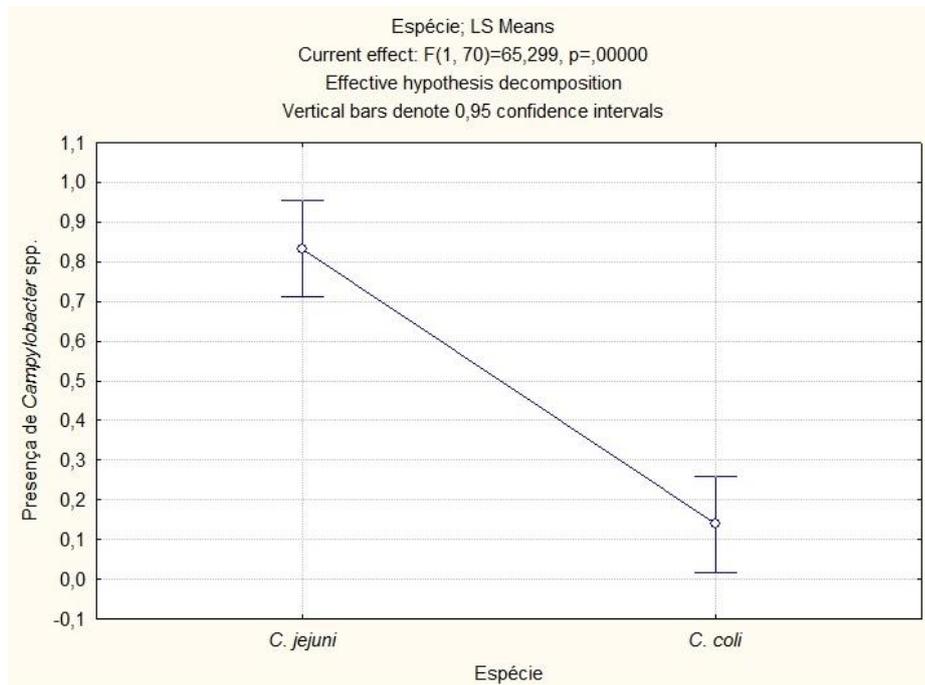


Figura 1. Espécies de *Campylobacter* identificadas através de testes genotípicos. *C. jejuni*: *Campylobacter jejuni*; *C. coli*: *Campylobacter coli*.

CARVALHO (2009), analisando amostras de sobrecoxas de frango resfriadas comercializadas em São Paulo, obteve 13 isolados de *Campylobacter* spp., sendo 30,77% dos isolados identificados como *C. jejuni* e 69,23% como *C. coli* através dos testes fenotípicos. Entretanto, através da genotipagem realizada por PCR, verificou-se uma alteração na ocorrência dessas espécies, identificando-se 81,25% dos isolados como *C. jejuni* e 18,75% como *C. coli*, demonstrando a importância da confirmação genotípica de isolados de *Campylobacter* spp. De acordo com o autor, o uso exclusivo de testes fenotípicos para identificação de espécies de *Campylobacter* spp. é limitado devido a ocorrência de isolados com reação atípicas nos testes fenotípicos, sendo necessária a utilização conjunta dos testes genotípicos confirmatórios para a identificação correta.

De modo semelhante, KOLACKOVA; KARPISKOVA (2005) realizaram um estudo comparando métodos fenotípicos e genotípicos para identificar espécies termofílicas de *Campylobacter* de origem alimentar e humana, utilizando 911 isolados. Com base na técnica de PCR, 85,1% das amostras foram identificadas como *C. jejuni*, 12,5% como *C. coli* e 2,3% como culturas mistas de *C. jejuni* e *C. coli*. Os autores constataram que 28,5% dos isolados não foram identificados corretamente pelos métodos convencionais. Além disso, a detecção das culturas mistas somente foi possível através da PCR.

4. CONCLUSÕES

A identificação genotípica de *Campylobacter* termófilos isolados de frangos resfriados, comercializados no sul do Rio Grande do Sul, através da PCR, mostrou-

se eficiente e confiável para a confirmação de isolados previamente identificados pelos métodos fenotípicos. Além disso, foi possível detectar culturas mistas, não identificadas pelos métodos convencionais de isolamento.

5. AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pelo apoio financeiro (Processo nº 483807/2012-5). À Capes, CNPq e FAPERGS pela concessão de bolsas de estudo. À Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) pela cessão das linhagens bacterianas utilizadas como controle.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, J.; OLIVEIRA, T.C.R.M. Presença de *Campylobacter* spp. em cortes refrigerados de frango. **Semina: Ciências Agrárias**, v.34, n.6, p.2829-2836, 2013.
- CARVALHO, A.F. **Detecção dos genes da Toxina Citoletal Distensiva (CDT) em estirpes de *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* isoladas de frangos de corte e hortaliças**. 2009. 56p. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio). Instituto Biológico, São Paulo, 2009.
- CDC (Centers for Disease Control and Prevention), 2014. ***Campylobacter: general information***. Acessado em 28 jul. 2014. Online. Disponível em: <http://www.cdc.gov/nczved/divisions/dfbmd/diseases/campylobacter/>
- FILGUEIRAS, A.L.L. Aspectos gerais de *Campylobacter* na segurança dos alimentos. In: VAZ, C.S.L. **Anais do Workshop de Diagnóstico Microbiológico de *Campylobacter* Aplicado à Avicultura**, Concórdia: Embrapa Suínos e Aves; Documentos 155, p.11-15, 2012.
- GRITTI, D.; VAZ, C.S.L.; VOSS-RECH, D.; ALVES, L.; BORTOLINI, F. Thermophilic *Campylobacter* survey in chilled and frozen poultry meat at retail in Concórdia, Santa Catarina. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.39, n.3, pub.976,2011.
- HUMPHREY, T.; O'BRIEN, S.; MADSEN, M. *Campylobacter* as zoonotic pathogens: A food production perspective. **International Journal of Food Microbiology**. n.117 p.237–257, 2007.
- JOSEFSEN, M.H.; LÜBECK, P.S.; HANSEN, F.; HOORFAR, J. Towards an international standard for PCR-based detection of foodborne thermotolerant campylobacters: interaction of enrichment media and pre-PCR treatment on carcass rinse samples. **Journal of Microbiological Methods**, v.58, p.39-48,2004.
- KOLACKOVA, I; KARPISKOVA, R. Species level identification of thermotolerant campylobacteres. **Veterinary Medicine**, Slezka, Praha, v.12, p.543-547, 2005.
- MACKIW, E.; KORSÁK, D.; RZEWUSKA, K.; TOMCZUK, K.; ROZYNEK, E. Antibiotic resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from food in Poland. **Food Control**, v.23, n.2, p.297-301, 2012.
- 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.
- WHO (World Health Organization), 2011. ***Campylobacter* - Fact sheet N° 255**. Acessado em 28 jul. 2014. Online. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs255/en/>
- WHO (World Health Organization), 2013. **The global view of campylobacteriosis: report of an expert consultation**, Utrecht, Netherlands, 9-11 July 2012.