

# PESQUISA DOS GENES *cdt* EM *Campylobacter* spp. ISOLADOS DE FEZES DE FRANGOS E AVES SILVESTRES

PRISCILA ALVES DIAS<sup>1</sup>; THAMÍRIS PEREIRA DE MORAES<sup>2</sup>; DAIANE WILSMANN<sup>3</sup>; JESSIKA BOEIRA<sup>4</sup>; CLÁUDIO DIAS TIMM<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas - [dias.alvespri@gmail.com](mailto:dias.alvespri@gmail.com)

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas - [thamiris.p@outlook.com](mailto:thamiris.p@outlook.com)

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas - [daianewilsmann@yahoo.com.br](mailto:daianewilsmann@yahoo.com.br)

<sup>4</sup>Universidade Federal de Pelotas - [jessikaboeira@yahoo.com.br](mailto:jessikaboeira@yahoo.com.br)

<sup>5</sup>Universidade Federal de Pelotas - [timmm@ufpel.tche.br](mailto:timmm@ufpel.tche.br)

## 1. INTRODUÇÃO

Atualmente, tem-se estudado o papel das aves silvestres como veiculadores de patógenos. Segundo ROSEF et al. (1985), devido à alta mobilidade em busca de alimento e reprodução, as mesmas podem ser consideradas reservatórios de *Campylobacter*, atuando como veiculadoras desse micro-organismo. O acesso das aves silvestres a aviários pode levar à contaminação da água dos bebedouros, da ração e da cama sobre a qual os frangos vivem. Uma vez no ambiente de produção, o patógeno pode ser levado com os frangos nas penas, na pele, nas patas, nas fezes e, posteriormente, contaminar a carne, durante o abate e o processamento das carcaças (HALD et al., 2004). Essencialmente não patogênico para as aves, esta bactéria não representa problema para os sistemas de produção avícola, sendo seu controle negligenciado nos aviários (GERMANO & GERMANO, 2003).

A campylobacteriose é uma doença transmitida por alimentos (DTA) para humanos, a qual afeta mais de 2 milhões de pessoas por ano (CDC, 2014). A produção da toxina cotoletaldistensiva (CDT), codificada pelos genes *cdt*, é considerada como fator de patogenicidade da bactéria, responsável pelos sinais clínicos em humanos (YOUNG et al., 2007).

Esse trabalho teve por objetivo pesquisar a presença dos genes *cdt* de *Campylobacter* isolado de fezes de frangos e aves silvestres capturadas no entorno de aviários.

## 2. METODOLOGIA

Quatorze cepas de *Campylobacter* previamente isoladas, 10 de fezes de frango e 4 de *Sicalis flaveola* foram identificados quanto à espécie e à presença dos genes *cdt*, através da técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). O DNA foi extraído, conforme recomendado por SAMBROOK & RUSSEL (2001), a partir de um *pellet* de colônias obtido diretamente das placas com culturas em ágar Columbia Columbia Blood Agar Base (Acumedia, Lansing, Michigan). O DNA foi analisado através da técnica de multiplex PCR para identificação das espécies *C. jejuni* e *C. coli*, de acordo com protocolo descrito por HARMON et al. (1997). Foram utilizados dois pares de *primers*: par pg 3/pg 50, que amplificam uma região altamente conservada relacionada aos genes da flagelina, tanto em *C. jejuni* como em *C. coli*, e o par C-1/C-4, que amplificam uma região específica somente presente em *C. jejuni*. Cada reação teve um volume final de 25 µL. Foram utilizados 12 µL de Master Mix (Promega, Madison, Wisconsin, USA), 2 µL (20 pmol) de cada *primer*, 1 µL de DNA (na concentração de 5nmol/µL) e 4 µL de água para completar o volume da reação. A amplificação foi realizada em termociclador TC-3000 (Techne) com o seguinte programa: desnaturação inicial

de 94°C por 4 min, seguido de 25 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento dos *primers* a 45°C por 1 min, extensão a 72°C por 1 min e extensão final a 72°C por 7 min. Como controle positivo, foi utilizada a cepa de *C. jejuni* ATCC 33291 e a cepa *C. coli* CCAMP1003, gentilmente cedida pelo setor de *Campylobacter* do Instituto Oswaldo Cruz do Rio de Janeiro. Para análise das ampliações, foi utilizada a técnica de eletroforese em gel de agarose a 1,5%. Para visualização das bandas foi utilizado GelRed (Uniscience, São Paulo, São Paulo, Brasil), um corante de ácidos nucleicos que emite fluorescência na presença de luz ultravioleta.

Após a identificação da espécie, foi feita a pesquisa de genes de virulência também através da técnica de multiplex PCR, de acordo com MARTINEZ et al. (2006), utilizando *primers* específicos para os genes *cdtA*, *cdtB* e *cdtC*. Para um volume final de 25 µL, foram utilizados 12 µL de Master Mix, 2 µL (20 pmol) de cada *primer* e 1 µL (5 nmol/µL) de DNA. A amplificação foi realizada com uma desnaturação inicial de 94°C por 5 min, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento a 57°C por 1 min, extensão a 72°C por 1 min e extensão final a 72°C por 5 min. Para análise do produto amplificado, foi utilizada a mesma técnica já descrita anteriormente.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos dez isolados de amostras de frangos, oito eram *C. jejuni* e dois *C. coli*, e dos quatro isolados de *S. flaveola*, três foram identificados como *C. coli* e um como *C. jejuni*. Todos isolados apresentaram os genes *cdt* e possuíam os três genes *cdtA*, *cdtB* e *cdtC*.

Resultados semelhantes foram obtidos por SILVA et al. (2014), que identificaram os genes *cdt* em 33/35 (91,7%) isolados de *C. jejuni* de fezes de frango. Nesse estudo, os autores também identificaram a presença dos genes *cdt* de *C. jejuni* isolados de produtos de frangos e fezes de humanos. A patogenia da campylobacteriose em humanos ainda não é bem conhecida, mas há uma correlação entre a produção de CDT e casos da doença em humanos, sendo esta toxina um dos fatores de virulência associado às infecções (VAN DEUN et al., 2007). JAIN et al. (2008) demonstraram que as cepas de *Campylobacter* produtoras de CDT apresentam alto poder de aderência, capacidade invasiva e citotoxicidade. A maioria dos países desenvolvidos tem programas de vigilância para *Campylobacter* e outras bactérias patogênicas transmitidas por alimentos. Estabelecer programas semelhantes em países em desenvolvimento poderia colaborar para o controle da disseminação da bactéria.

Ao contrário do que ocorre com os animais de produção, o relato sobre patógenos de origem alimentar em aves silvestres são raros e bastante variáveis quanto aos resultados, sendo este o primeiro relato de identificação dos genes *cdt* em *Campylobacter* isolados desses animais.

### 4. CONCLUSÕES

*Campylobacter* isolados de frangos e *S. flaveola* possuem os genes *cdt*, indicando ser estas cepas potencialmente patogênicas.

### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION [CDC]. Vital Signs: Incidence and Trends of Infection with Pathogens Transmitted Commonly Through

Food --- Foodborne Diseases Active Surveillance Network, 10 U.S. Sites, 1996-2010. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v.60, n. 22, p. 749-755, 2014.

GERMANO, P.M.L., GERMANO, M.I.S. Agentes bacterianos de toxinfecções. In: GERMANO, P.M.L.; GERMANO, M.I.S. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos**. Ed. 2, Editora Varela, 2003, p. 215-275.

HALD, B.; SKOVGÅRD, H.; BANG, D. D.; PEDERSEN, K.; J. DYBDAHL; JESPERSEN J. B.; MADSEN, M. Flies and *Campylobacter* infection of broiler flocks. **Emerging Infectious Diseases**, vol. 10, n. 8, p. 1490-1492, 2004.

HARMON, K.M.; RANSOM, G.M.; WESLEY, I.V. Differentiation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by polymerase chain reaction. **Molecular and Cellular Probes**, n. 11, p. 195-200, 1997.

JAIN, D.; PRASAD, K.N.; SINHA, S.; HUSAIN, N. Differences in virulence attributes between cytolethal distending toxin positive and negative *Campylobacter jejuni* strains. **Journal of Medical Microbiology**, v. 57, p. 267-272, 2008.

MARTINEZ, I.; MATEO, E.; CHURRUCA, E.; et al. Detection of *cdtA*, *cdtB*, and *cdtC* genes in *Campylobacter jejuni* by multiplex PCR. **International Journal Medical of Microbiology**, v. 296, p. 45-48, 2006.

ROSEF, O.; KAPPERUD, G., LAUWERS, S.; GONDROSEN, B. Serotyping of *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* e *Campylobacter lariidis* from domestic and wild animals. **Applied and Enviromental Microbiology**, v. 49, n. 6, p. 1507-1510, 1985.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SILVA, D.T.; TEJADA, T.S.; CUNHA; C.C.; LOPES; N.A.; AGOSTINETTO, A.; COLLARES, T., LEON, P.M.M.; TIMM, C.D. Ocorrência de *Campylobacter* em carne de frango, fezes de frango e humanas e pesquisa dos genes *cdt*. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.66, n.1, p.297-304, 2014.

VAN DEUN, K.; HAESEBROUCK, F.; HEYNDRICKX, M.; et al. Virulence properties of *Campylobacter jejuni* isolates of poultry and human origin. **Journal of Medical Microbiology**, v.56, p.1284-1289, 200.

YOUNG, K.T.; DAVIS, L.M.; DIRITA, V.J. *Campylobacter jejuni*: molecular biology and pathogenesis. **Nature Reviews**, v. 5, p. 665-679, 2007.