

HERPICH, J. I.<sup>1</sup>; ROCHA, S. L. S.<sup>1</sup>; RODRIGUES, E. E.<sup>1</sup>; TEJKOWSKI, T.<sup>1</sup>; HILLER, C. C.<sup>1</sup>; SIERRA, Y. M.<sup>1</sup>; PERDONCINI, G.<sup>1</sup>; NASCIMENTO, V. P.<sup>1</sup>; MORAES, H. L. S.<sup>1</sup>; SALLE, C. T. P.<sup>1</sup>

## INTRODUÇÃO

A campilobacteriose é uma zoonose de distribuição mundial, que causa gastroenterite em humanos. A ocorrência de surtos alimentares causados por bactérias do gênero *Campylobacter* tem sido relacionada ao consumo de produtos de origem animal, principalmente os produtos de origem avícola. As vias de transmissão para o ser humano incluem a ingestão de carnes de aves cruas ou mal cozidas, bem como de leite não pasteurizado, o consumo de água e vegetais contaminados e o contato direto com animais portadores.

Fatores de virulência são mecanismos que as bactérias utilizam para “driblar” o sistema de defesa do hospedeiro e causar a infecção. Os genes *cdtA*, *cdtB* e *cdtC* codificam a CDT (*Citotoxina Letal Distensiva*), considerada um dos principais fatores de virulência de *Campylobacter jejuni*. A CDT interfere na divisão e diferenciação das células das criptas intestinais, contribuindo para o desenvolvimento da diarreia. O gene *cdtB* codifica proteínas para a atividade e toxicidade dos componentes da toxina. Os genes *cdtA* e *cdtC* estão envolvidos na aderência e interiorização na célula hospedeira (CARVALHO, 2010). A presença dos três genes é requerida para a atividade da toxina (ASAKURA et al., 2007).

## OBJETIVO

Verificar a presença dos genes *cdtA*, *cdtB* e *cdtC* em amostras de *Campylobacter jejuni* isoladas a partir de cecos de frangos de corte, por meio da técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase).

## MATERIAL E MÉTODO

### Amostras:

Foram utilizadas 13 amostras de *Campylobacter jejuni*, isoladas e identificadas por meio de técnica de PCR. Como controle positivo dos ensaios, utilizou-se a cepa padrão *Campylobacter jejuni* ATCC 29428.

### Padronização dos protocolos:

Foram selecionados três pares de *primers* para a pesquisa dos genes do complexo CDT em *Campylobacter jejuni*, com base na literatura descrita por Datta; Niwa; Itoh (2003) e Wieczorek; Osek, (2008) (Quadro 1). As condições de PCR foram adaptadas de Datta; Niwa; Itoh (2003) (Quadro 2).

Quadro 1: Sequências de *primers* utilizados.

Primer	Sequencia
<i>cdtA1</i>	5'CCTTGTGATGCAAGCAATC3'
<i>cdtA2</i>	5'ACACTCCATTGCTTTCTG3'
<i>cdtB1</i>	5'CAGAAAAGCAAATGGAGTGTT3'
<i>cdtB2</i>	5'AGCTAAAAGCGGTGGAGTAT3'
<i>cdtC1</i>	5'CGATGAGTAAAACAAAAGATA3'
<i>cdtC2</i>	5'TTGGCATTATAGAAAATACAGTT3'

Quadro 2: Concentrações e quantidades de reagentes de cada PCR

MIX	<i>cdtA</i>	<i>cdtB</i>	<i>cdtC</i>
Água Milli-Q (µL)	20,15	20,15	20,4
Tampão (µL)	3	3	3
dNTP (2,5mmol)	2,4	2,4	2
MgCl <sub>2</sub> (µL)	1,25 (2mM)	1,25(2mM)	1 (1,5mM)
Primer (cada)	1	1	1
Taq polimerase (1U) (µL)	0,2	0,2	0,2
DNA (µL)	1	1	1
Total (µL)	30	30	30

## REFERÊNCIAS

- ASAKURA, M.; et al. Comparative analysis of cytotoxin distending toxin (cdt) genes among *Campylobacter jejuni*, *C. coli* and *C. fetus* strains. *Microbial Pathogenesis*, London, v.42, n.5/6, p.174-183, 2007.
- CARVALHO, A.F. et al. Detecção dos genes da toxina citotética distensiva em estirpes de *Campylobacter jejuni* isoladas de carcaças de frangos. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* [online]. v.62, n.5, pp. 1054-1061. 2010.
- DATTA, S.; NIWA, H.; ITOH, K. Prevalence of 11 pathogenic genes of *Campylobacter jejuni* by PCR in strains isolated from humans, poultry meat and broiler and bovine faeces. *J. Med. Microbiol.*, v.52, p.345-348, 2003.
- WIECZOREK, K.; OSEK, J. Identification of virulence genes in *Campylobacter jejuni* and *C. coli* isolates by PCR. *Bull Vet Inst Pulawy* v. 52, p. 211-216, 2008
- ROZYNEK, E.; et al. Prevalence of potential virulence markers in Polish *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates obtained from hospitalized children and from chicken carcasses. *Journal of Medical Microbiology*, London, v.54, p.615-619, 2005.
- THOMÉ, J. D. S. Citotoxinas e hemolisinas produzidas por *Campylobacter jejuni* isolados de diferentes origens. Dissertação (Mestre em Genética e Biologia Molecular) - Instituto de Biologia. Campinas: Universidade Estadual de Campinas, 2006.

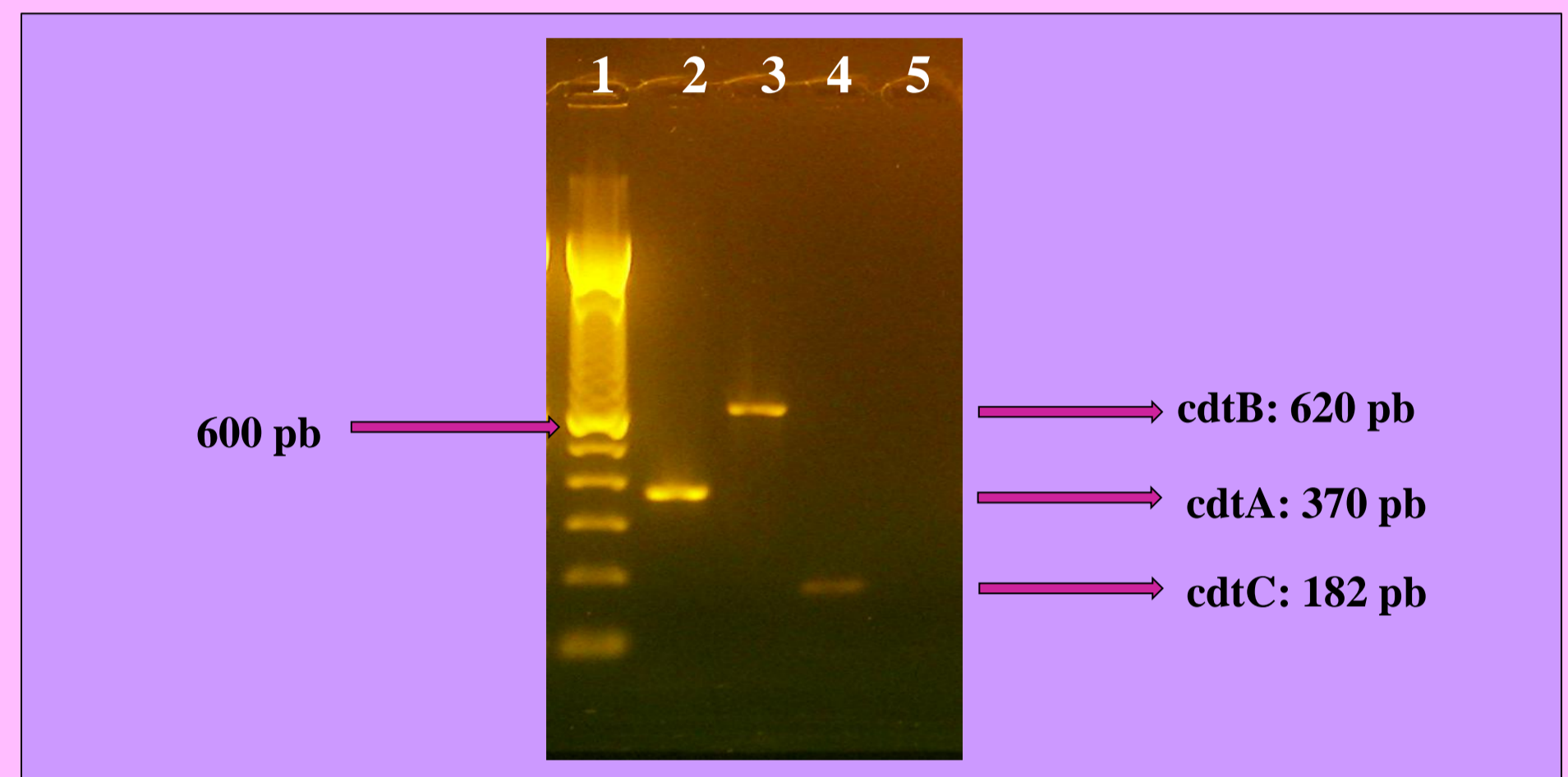


Figura 1: Visualização através de luz UV de gel de agarose 2%, corado com brometo de etídio. 1-Marcador de peso molecular de 100pb. 2 amostra positiva para o gene *cdA*. 3: amostra positiva para o gene *cdtB*. 4: amostra positiva para o gene *cdtC*.5: controle negativo.

## RESULTADOS

Das amostras testadas, 100% (13/13) foram positivas para *cdtA*, 84,6% (11/13) positivas para *cdtB* e 92, 3% (12/13) positivas para *cdtC*. 84,6% foram positivas para os três genes. A figura 1 apresenta uma foto do gel de agarose 2% corado com brometo de etídio com a presença de três amostras positivas, uma para cada gene.

Os resultados estão de acordo com a literatura consultada, que relata frequências, geralmente, próximas a 100% para os três genes. Datta; Niwa; Itoh (2003) relataram a frequência de 100% para os genes nas amostras pesquisadas, que incluíam carne de frango, fezes de frango, fezes de bovinos e amostras clínicas de humanos. Da mesma forma, Rozynek et al. (2005) encontraram 100% em isolados de carcaças de frangos. Wieczorek; Osek, (2008) relataram em amostras de fezes de aves, 87,5% positivos para *cdtA*, 75% para *cdtB* e 90% para *cdtC*.

No Brasil, são escassos os estudos sobre CDT em amostras de *Campylobacter jejuni*. Thomé (2006) pesquisou somente *cdtB* e relatou frequências de 100%, 92%, 87% e 85% nas amostragens ambiental, humana, animal e alimentar, respectivamente. Por outro lado, Carvalho (2010) ao pesquisar *Campylobacter jejuni* em carcaças de aves relatou o complexo CDT em apenas 36,4% das amostras.

## CONCLUSÕES

Foi possível verificar a presença dos genes de virulência *cdtA*, *cdtB* e *cdtC* nas amostras estudadas, por meio da técnica de PCR.

Os resultados encontrados estão de acordo com a literatura, que relata variações próximas a 100% na prevalência destes genes nas amostras pesquisadas; não obstante, é necessária a análise de um maior número de amostras para verificar a importância e o aparecimento destes genes nos isolados no Brasil.