

Pesquisa dos Genes *cdtA*, *cdtB* e *cdtC* em amostras de *Campylobacter jejuni* isoladas de frango de corte.

Gabriel Luz da Silva
Prof. Orientador Carlos Tadeu Pippi Salle

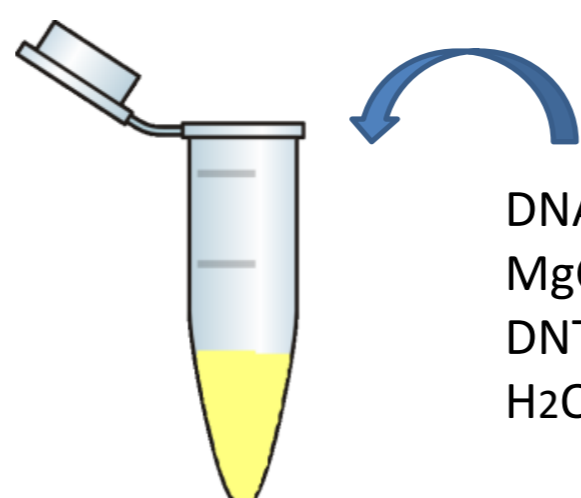
INTRODUÇÃO

Campylobacter spp. é uma bactéria que têm sido associado a infecções alimentares, principalmente ao consumo de produtos de origem avícola, leite não pasteurizado, água contaminada e verduras cruas. Em humanos a manifestação mais comum são as gastroenterites e tem sido associada com a ocorrência da síndrome de Guillain Barré. As bactérias utilizam mecanismos de virulência para aderir e colonizar o epitélio intestinal e causar a infecção. Os genes *cdtA*, *cdtB*, *cdtC*, que codificam a Citotoxina Letal Distensiva - CDT, que é considerada um dos principais fatores de virulência de *Campylobacter jejuni*, principal espécie envolvida. Os genes *cdtA* e *cdtC* estão envolvidos na aderência e na penetração à célula hospedeira e o *cdtB* está diretamente ligado a produção da toxina que causa dano ao DNA (ácido desoxirribonucléico), exibe uma atividade semelhante à DNase-I, resultando em cortes no DNA dupla fita, bloqueando a fase da divisão celular, induzindo uma distensão citoplasmática que leva à morte da célula. A presença dos três genes *cdt* é requerida para uma plena atividade da toxina.

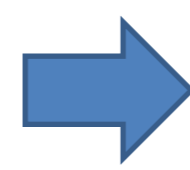
MATERIAIS E MÉTODO

- Amostras de *Campylobacter jejuni* conservadas a -80° C;
- Foram utilizados 36 amostras isoladas de frangos de corte;
- Extração do DNA (Borsoi, 2009);
- Pesquisa dos genes *cdtA*, *cdtB* e *cdtC* através da técnica de PCR;
- Produtos do PCR visualizados com a técnica de eletroforese em gel de agarose a 2%.

Extração por calor em equipamento de Banho Maria



DNA, Primers, MgCl₂, DNTP's, Taq, H₂O, Tampão



Termociclador



Eletroforese



Primers utilizados

Genes	Forward	Reward
<i>cdtA</i>	5'CCTTGTGATGCAAGCAATC3'	5'ACACTCCATTGCTTTCTG3'
<i>cdtB</i>	5'CAGAAAGCAAATGGAGTGT3'	5'AGCTAAAAGCGGTGGAGTAT3'
<i>cdtC</i>	5'CGATGAGTTAAAACAAAAAGATA3'	5'TTGGCATTATAGAAAATACAGTT3'

RESULTADOS

- Das amostras testadas, 88 % (32/36) foram positivas para *cdtA*, 91 % (33/36) positivas para *cdtB* e 86 % (31/36) positivas para *cdtC*. E 86 % foram positivas para os três genes.
- Os resultados são próximos aos encontrados na literatura, que relatam frequências próximas a 100% para os três genes. Datta; Niwa; Itoh (2003) relataram frequência de 100% para os genes nas amostras pesquisadas que incluíram carne de frango, fezes de frango, fezes de bovinos. Da mesma forma, Rozynek *et al.* (2005) encontraram 100% em isolados de carcaças de frangos. Wiczorek; Osek, (2008) identificaram em amostras de fezes de aves, 87,5% positivos para *cdtA*, 75% para *cdtB* e 90% para *cdtC*.
- No Brasil, são poucos 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.

Gráfico 1. Presença dos genes do complexo CDT nas amostras de *Campylobacter jejuni*.

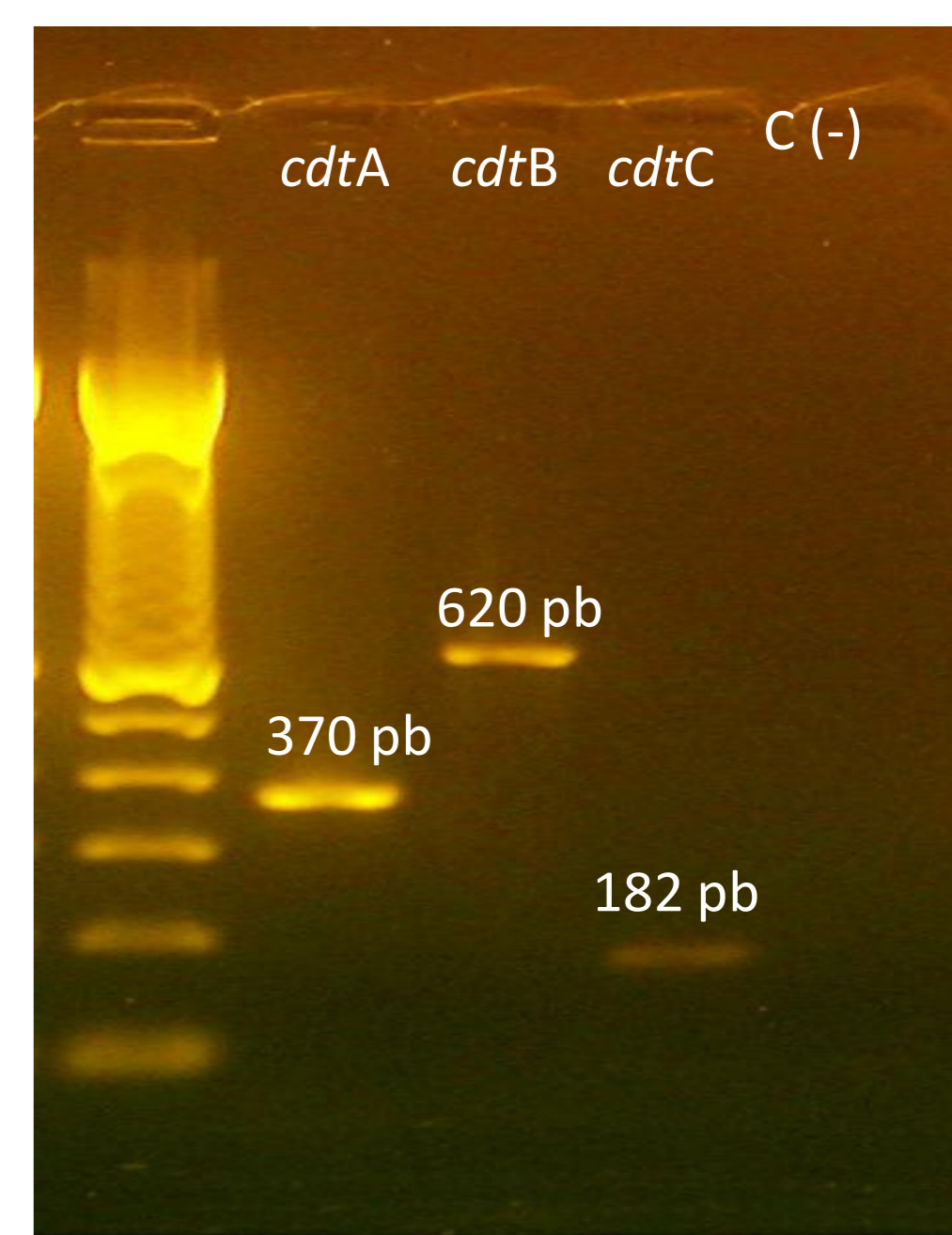
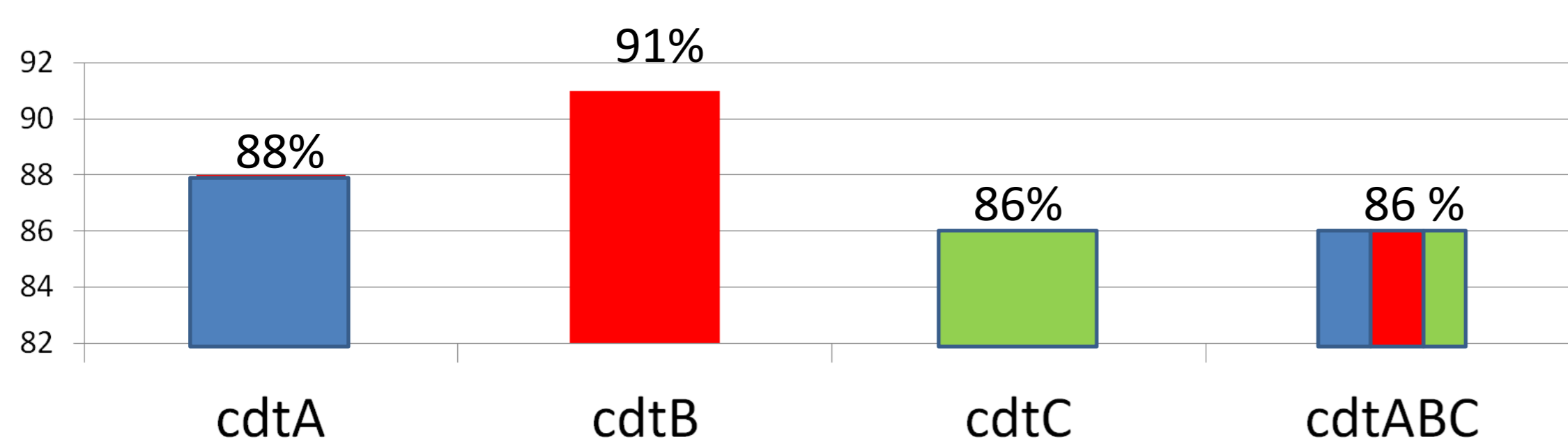


Figura 1: Visualização do gel em luz UV em gel de agarose 2%. 1- Marcador de peso molecular de 100 pb. 2 amostra positiva para o gene *cdtA*. 3 amostra positiva para o gene *cdtB*. 4: amostra positiva para o gene *cdtC*. 5: controle negativo.

CONCLUSÕES

- Foram identificados 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 de 90 a 100% na prevalência destes genes. É importante a análise de um maior número de amostras para averiguar a importância e o aparecimento destes genes nos isolados de *Campylobacter jejuni* no Brasil e no futuro associar com outros fatores de virulência que permitam caracterizar melhor as amostras circulantes.

Referências:

- BORSOI, A. *et al.*. An inoculation of newly hatched broiler chicks with two Brazilian isolates of *Salmonella* Heidelberg strains with different virulence gene profiles, antimicrobial resistance and pulsed field electrophoresis patterns to intestinal changes evaluation. *Poultry Science*, v.88, p.750-758, 2009.
- CARVALHO, A.F. *et al.* Detecção dos genes da toxina citolética distensiva e 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.
- 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, Universidade Estadual de Campinas, 2006.
- 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.