

POTENCIAL DE ADESÃO, INVASÃO E PRODUÇÃO DE CITOTOXINAS DE *C. jejuni* ISOLADOS DA CADEIA PRODUTIVA DE FRANGOS DE CORTE

TASSIANA RAMIRES¹; NATALIE RAUBER KLEINUBING²;
SIMONE DE FÁTIMA RAUBER WÜRFEL²; MAURICÉIA GREICI DE OLIVEIRA³;
ÂNGELA MARIA FIORENTINI²; WLADIMIR PADILHA DA SILVA⁴

¹Universidade Federal de Pelotas – tassianaramires@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – natalierk10@hotmail.com; simone_rauber@hotmail.com

³Instituto Federal Farroupilha – greici_sel@yahoo.com.br

⁴Universidade Federal de Pelotas – wladimir.padilha2011@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A campilobacteriose humana é uma doença transmitida por alimentos, causada por micro-organismos pertencentes ao grupo denominado *Campylobacter* termofílicos. Esses patógenos são atualmente os principais causadores de gastroenterite em todo o mundo (KIM et al., 2017; TEH et al., 2017). Esse grupo compreende quatro diferentes espécies (*C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* e *C. upsaliensis*) as quais possuem essa denominação por apresentarem uma temperatura ótima de multiplicação entre 42 °C e 43 °C (MOORE et al., 2005). Dentre essas espécies, *C. jejuni* se destaca como o principal causador da campilobacteriose (BOLTON, 2015; KIRK et al., 2015). A principal fonte de contaminação por essa bactéria é através da carne de frango, visto serem as aves os principais hospedeiros desse patógeno. A predileção por esses animais se deve ao fato da sua temperatura corporal coincidir com a temperatura ótima de multiplicação do patógeno (HALD et al., 2016).

Apesar desses micro-organismos apresentarem metabolismo fastidioso e serem submetidos a condições adversas ao longo da cadeia produtiva de frangos de corte, seus mecanismos de sobrevivência e infecção ainda não são bem compreendidos (REPÉRANT et al., 2016). Contudo, sabe-se que os principais fatores de virulência dessas bactérias são a adesão, invasão e a produção de toxinas (BOLTON, 2015). A caracterização de isolados virulentos desempenha um papel fundamental na epidemiologia de doenças infecciosas, gerando as informações necessárias para a identificação, rastreamento e intervenção em surtos de doenças (URWIN & MAIDEN, 2003).

O gene *cadF* codifica uma proteína que interage com a fibronectina da matriz extracelular do hospedeiro, participando da colonização da superfície celular (MONTEVILLE et al., 2002), enquanto o gene *ciaB* codifica uma proteína envolvida na invasão celular (RIVERA-AMILL et al., 2001). *Campylobacter jejuni* sintetiza, entre outras, a toxina citotética distensiva (CDT), sendo três os genes responsáveis pela codificação desta toxina: *cdtA*, *cdtB* e *cdtC*. Para garantir a máxima atividade da toxina, os três genes devem ser expressos (ASAKURA et al., 2007). Dentro da célula, essa proteína irá causar o bloqueio do ciclo celular, pois apresenta uma atividade semelhante à DNase, resultando na degradação do DNA. Por fim, as células do hospedeiro respondem à degradação (SMITH & BAYLES, 2006), bloqueando certas fases na divisão celular, o que resulta na distensão citoplasmática, ocasionando a morte celular (ABUOUN et al., 2005).

Frente ao exposto, o objetivo deste estudo foi avaliar o perfil de virulência de *C. jejuni* oriundos da cadeia produtiva de frangos de corte da região sul do Rio Grande do Sul, Brasil.

2. METODOLOGIA

O estudo foi realizado a partir de 246 isolados de *C. jejuni* pertencentes à bacterioteca de micro-organismos do Laboratório de Microbiologia de Alimentos da FAEM/UFPEL. Esses isolados são oriundos da cadeia produtiva de frangos de corte da região sul do Rio Grande do Sul e foram coletados entre os anos de 2014 e 2016. Para a verificação da presença dos genes de virulência, primeiramente se realizou a extração do DNA genômico, segundo o protocolo descrito por SAMBROOK & RUSSELL (2001), e em seguida a reação em cadeia da polimerase (PCR). Os genes avaliados foram *cadF*, *ciaB* e o operon *cdtABC*, usando os *primers* e condições previamente descritos por ZENG et al. (2006), KONKEL et al. (1999a) e DATTA et al. (2003), respectivamente.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os 246 isolados (100%) de *C. jejuni*, oriundos da cadeia produtiva de frangos de corte da região sul do Rio Grande do Sul, apresentaram os cinco genes pesquisados neste estudo. A Figura 1 ilustra a amplificação, por PCR, dos cinco fragmentos esperados para cada um dos genes de virulência avaliados em um isolado de *C. jejuni* e visualizados em gel de agarose.

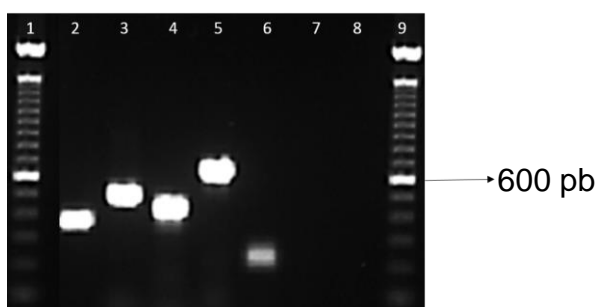


Figura 1. Eletroforese em gel de agarose 1,5% demonstrando a amplificação por PCR de genes associados à virulência em um isolado de *Campylobacter jejuni*. 1: marcador de tamanho molecular (*Ladder* 100pb); 2: gene *cdtA* (370pb); 3: gene *ciaB* (527pb); 4: gene *cadF* (400pb); 5: gene *cdtB* (620pb); 6: gene *cdtC* (182pb); 7: controle negativo (*Salmonella* Enteritidis (ATCC 13076)); 8: controle da reação (sem DNA); 9: marcador de tamanho molecular (*Ladder* 100pb)

CASABONNE et al. (2016) também verificaram a presença do gene *cadF* em 100% dos isolados clínicos avaliados. Esse resultado era esperado, tendo em vista que esse é um gene altamente conservado nessa espécie (KONKEL et al., 1999a). A presença do gene *ciaB* tem sido variável em diferentes estudos. MELO et al. (2013) encontraram 67,3% dos isolados portando esse gene, enquanto que uma prevalência de 95% foi relatada por QUETZ et al. (2012). Assim como observado em nosso estudo, GHORBANALIZADGAN et al. (2014) e ABU-MADI et al. (2016) também verificaram que todos os isolados carregavam o gene associado à invasão celular. A presença dos genes *cdtABC* em todos os isolados, relatada nessa pesquisa, também foi reportada por outros autores (DATTA et al., 2003, QUETZ et al., 2012, WIECZOREK et al., 2015). Entretanto, CARVALHO et al. (2010) e TRINDADE et al. (2015), observaram que 36,4% e 38% dos isolados provenientes de frango resfriado e de abatedouro de frangos, respectivamente, portavam estes genes, demonstrando que há diferença no potencial de virulência entre isolados de *C. jejuni*.

A presença desses genes sugere o alto potencial de virulência dos isolados provenientes da cadeia produtiva de frangos de corte da região sul do Rio Grande do Sul. Sabe-se que isolados mutantes, apresentando deleções nos genes *cadF* e *ciaB*, possuem redução na sua capacidade de adesão e internalização, avaliadas em ensaios celulares (KONKEL et al., 1999b; MONTEVILLE et al., 2003). Com relação ao operon *cdtABC*, é de se destacar que a toxina CDT promove dano ao DNA, assim, sua presença pode estar associada ao aumento no grau de severidade da doença causada por *C. jejuni* (GHORBANALIZADGAN et al., 2014).

4. CONCLUSÕES

Os isolados de *C. jejuni* provenientes da cadeia produtiva de frangos de corte da região sul do Rio Grande do Sul apresentam alto potencial de virulência por carregarem os principais genes envolvidos no seu mecanismo de patogenicidade.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABU-MADI, M.; BEHNKE, J.M.; SHARMA, A., et al., Prevalence of Virulence/Stress Genes in *Campylobacter jejuni* from Chicken Meat Sold in Qatari Retail Outlets. **PLoS ONE**, 11, 6, 2016.
- ABUOUN, M.; MANNING, G.; CAWTHRAW, S. A., et al.. Cytolethal distending toxin (CDT) - negative *Campylobacter jejuni* strains and anti-CDT neutralizing antibodies are induced during human infection but not during colonization in chickens. **Infection and Immunity**, v.73, p.3053-3062, 2005.
- ASAKURA, M.; SAMOSORNSUK, W.; TAGUCHI, M., et al.. Comparative analysis of cytolethal distending toxin (*cdt*) genes among *Campylobacter jejuni*, *C. coli* and *C. fetus* strains. **Microbiology Pathogenesis**, v.42, p.174-183, 2007.
- BOLTON, D. J. *Campylobacter* virulence and survival factors. **Food Microbiology**, v.48, p.99-108, 2015.
- CARVALHO, A. F., SILVA, D. M., AZEVEDO, S. S., et al.. Detecção dos genes da toxina citoletal distensiva em cepas de *Campylobacter jejuni* isoladas de carcaças de frangos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.62, p.1054-1061, 2010.
- CASABONNE, C.; GONZALEZ, A.; AQUILI, V., et al.. Prevalence of Seven Virulence Genes of *Campylobacter jejuni* Isolated from Patients with Diarrhea in Rosario, Argentina. **International Journal of Infection**, 2016.
- 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. **Journal of Medical Microbiology**, v.52, p.345–348, 2003.
- GHORBANALIZADGAN, M., BAKHSHI, B., LILI, A.K., et al.. A molecular survey of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* virulence and diversity. **Iranian Biomedical Journal**, v.18, p.157-163, 2014.
- HALD, B.; SKOV, M.N.; NIELSEN, E.M.; et al.. *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in wild birds on Danish livestock farms. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.58, 2016.
- KIM, S.H.; PARK, C.; LEE, E.J., et al.. Biofilm formation of *Campylobacter* strains isolated from raw chickens and its reduction with DNase I treatment. **Food Control**, v.71, p.94-100, 2017.

- KIRK, M.D.; PIRES, S.M.; BLACK, R.E., et al.. World Health Organization Estimates of the Global and Regional Disease Burden of 22 Foodborne Bacterial, Protozoal, and Viral Diseases, 2010: a data synthesis. **PLoS Med**, v.12, 2015.
- KONKEL, M.E.; GRAY, S.A.; KIM, B.J., et al.. Identification of the enteropathogens *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* based on the *cadF* virulence gene and its product. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, p.510-517, 1999a.
- KONKEL, M.E.; KIM, B.J.; RIVERA-AMILL, V.; GARVIS, S.G. Bacterial secreted proteins are required for the internalization of *Campylobacter jejuni* into cultured mammalian cells. **Molecular Microbiology**, v.32, p.691-701, 1999b.
- MELO, R.T.; NALEVAIKO, P.C.; MENDONÇA, E.P. et al.. *Campylobacter jejuni* strains isolated from chicken meat harbour several virulence factors and represent a potential risk to humans. **Food Control**, v.33, p. 227-231, 2013.
- MONTEVILLE, M. R.; KONKEL, M. E. Fibronectin-facilitated invasion of T84 eukaryotic cells by *Campylobacter jejuni* occurs preferentially at the basolateral cell surface. **Infection and Immunity**, v.70, p.6665–6671, 2002.
- MONTEVILLE, M. R.; YOON, J. E.; KONKEL, M. E. Maximal adherence and invasion of INT 407 cells by *Campylobacter jejuni* requires the CadF outer membrane protein and microfilament reorganisation. **Microbiology**, v.149, p.153-165, 2003.
- MOORE, J. E.; CORCORAN, D.; DOOLEY, J. S. G., et al.. *Campylobacter*. **Veterinary Research**, v.36, p.351-382, 2005.
- QUETZ, J.S., LIMA, I.F., HAVT, A., et al.. *Campylobacter jejuni* infection and virulence-associated genes in children with moderate to severe diarrhea admitted to emergency rooms in northeastern. **Journal of Medical Microbiology**, v.61, p.507-513, 2012.
- REPÉRANT, E.; LAISNEY, M.J.; NAGARD, B., et al.. Influence of enrichment and isolation media on the detection of *Campylobacter* spp. in naturally contaminated chicken samples. **Journal of Microbiological Methods**, v.128, p.42–47, 2016.
- RIVERA-AMILL, V.; KIM, B. J.; SESHU, J.; KONKEL, M. E. Secretion of the virulence associated *Campylobacter* invasion antigens from *Campylobacter jejuni* requires a stimulatory signal. **The Journal of Infectious Diseases**, v.183, p.1607-1616, 2001.
- SAMBROOK, J. & RUSSELL, D.W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 3ª ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001.
- SMITH, J. L. & BAYLES, D. O. The contribution of cytolethal distending toxin to bacterial pathogenesis. **Critical Reviews in Microbiology**, v.32, p.227- 248, 2006.
- TEH, A.H.T.; MAELEE, S.; GARY A.DYKES, G.A. The influence of dissolved oxygen level and medium on biofilm formation by *Campylobacter jejuni*. **Food Microbiology**, v.61, p.120-125, 2017.
- TRINDADE, M.M., PERDONCINI, G., SIERRA-ARGUELLO, et al.. Detecção dos genes codificantes da toxina CDT e pesquisa de fatores que influenciam na produção de hemolisinas em amostras de *Campylobacter jejuni* de origem avícola. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.35, p.709-715, 2015.
- URWIN, R. & MAIDEN, M. C. J. Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology. **Trends in Microbiology**, v.11, n.10, p.479-487, 2003.
- WIECZOREK, K., DENIS, E., OSEK, J. Comparative analysis of antimicrobial resistance and genetic diversity of *Campylobacter* from broilers slaughtered in Poland, *International Journal of Food Microbiology*, v.210, p.24-32, 2015.
- ZHENG, J.; MENG, J.; ZHAO, S., et al.. Adherence to and Invasion of Human Intestinal Epithelial Cells by *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* Isolates from Retail Meat Products. **Journal of Food Protection**, v.69, p.768-774, 2006.