

## DETECÇÃO DE GENES ENVOLVIDOS NA BIOSSÍNTESE DE LIPO-OLIGOSSACARÍDEOS (LOS) DE *Campylobacter jejuni* ISOLADOS NA CADEIA PRODUTIVA DE FRANGOS DO RIO GRANDE DO SUL

SIMONE DE FÁTIMA RAUBER WÜRFEL<sup>1</sup>; NATALIE RAUBER KLEINUBING<sup>2</sup>;  
TASSIANA RAMIRES<sup>3</sup>; VIOLETTA DIAS PACCE<sup>4</sup>; WLADIMIR PADILHA DA  
SILVA<sup>5</sup>; ODIR ANTONIO DELLAGOSTIN<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – [simone\\_rauber@hotmail.com](mailto:simone_rauber@hotmail.com)

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – [natalierk10@hotmail.com](mailto:natalierk10@hotmail.com)

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – [tassianaramires@gmail.com](mailto:tassianaramires@gmail.com)

<sup>4</sup>Universidade Federal de Pelotas – [violettapacce@gmail.com](mailto:violettapacce@gmail.com)

<sup>5</sup>Universidade Federal de Pelotas – [silvawp@ufpel.edu.br](mailto:silvawp@ufpel.edu.br)

<sup>6</sup>Universidade Federal de Pelotas – [odir@ufpel.edu.br](mailto:odir@ufpel.edu.br)

### 1. INTRODUÇÃO

*Campylobacter jejuni* é a principal causa bacteriana de gastroenterite alimentar em todo o mundo (MULLER et al., 2007). A doença geralmente é associada ao consumo de carne de frango, normalmente contaminada durante as etapas de abate e processamento, como resultado do extravasamento de conteúdo intestinal, uma vez que o micro-organismo é habitante comum do trato intestinal dos frangos (KOOLMAN et al., 2015).

Além de causar gastroenterite aguda, a infecção por *C. jejuni* tem sido descrita como um antecedente frequente no desenvolvimento da Síndrome de Guillain-Barré (GBS), uma forma de neuropatia que é a causa mais comum de paralisia generalizada (GILBERT et al., 2000). O mimetismo de gangliosídeos pelo lipo-oligosacarídeo (LOS) de *C. jejuni* é considerado um fator crítico no desencadeamento da neuropatia após a infecção pelo patógeno (LINTON et al., 2000). Acredita-se que os anticorpos gerados contra o LOS de *C. jejuni* reajam de forma cruzada com os gangliosídeos encontrados no sistema nervoso humano, levando à paralisia observada nos pacientes com GBS (YUKI, 1997). Além disso, anticorpos anti-GM1 são frequentemente encontrados em pacientes com GBS (LINTON et al., 2000).

Alguns genes envolvidos na biossíntese de gangliosídeos-like foram caracterizados. Dentre eles, *cgtB* e *wlaN*, que codificam  $\beta$ -1,3 galactosiltransferases putativas, foram detectados na maioria das cepas fortemente invasivas e raramente em cepas não invasivas de *C. jejuni* (MULLER et al., 2007). De acordo com a literatura, o gene *cgtB* codifica para uma  $\beta$ -1,3 galactosiltransferase envolvida na geração de LOS GT1a-like em *C. jejuni* OH4384 (GILBERT et al., 2000), enquanto que o gene *wlaN* codifica para uma  $\beta$ -1,3 galactosiltransferase envolvida na biossíntese de LOS GM1-like e GM2-like em *C. jejuni* NCTC 11168 (LINTON et al., 2000).

O mimetismo molecular das estruturas hospedeiras pela porção de sacarídeos do LOS é considerado um importante fator de virulência, o qual pode ser usado como uma estratégia para evadir a resposta imune. Deste modo, a identificação dos genes envolvidos na biossíntese de LOS de *C. jejuni* é de grande interesse para uma melhor compreensão dos mecanismos de patogênese utilizados pela bactéria (GILBERT et al., 2000). Diante do exposto, o objetivo deste estudo foi detectar a presença dos genes *cgtB* e *wlaN* em *C. jejuni* isolados na cadeia produtiva de frangos do Rio Grande do Sul.

### 2. METODOLOGIA

Foram testados 205 *C. jejuni* isolados de granja avícola, abatedouro de frangos, e carne de frango comercializada no Rio Grande do Sul (Tabela 1).

Tabela 1. Descrição dos isolados de *Campylobacter jejuni* analisados

Procedência	Amostra	Isolados
Granja	Swab cloacal	26
Granja	Swab de arraste	02
Abatedouro	Ambiente de processamento	04
Abatedouro	Ceco de frango	15
Abatedouro	Fígado de frango	13
Abatedouro	Carcaça de frango	56
Comércio	Carne de frango	89

A extração de DNA dos isolados foi realizada utilizando o *illustra bacteria genomicPrep Mini Spin Kit* (GE Healthcare Life Sciences®) a partir do cultivo de 24 h em *Blood agar base No 2* (Oxoid®) com 5% de sangue equino lisado. O DNA bacteriano foi quantificado por espectrofotometria (Qubit; Invitrogen®) e submetido à *Polymerase Chain Reaction* (PCR) para detecção de dois genes envolvidos na biossíntese de LOS de *C. jejuni*. Os genes *cgtB* e *wlaN* foram pesquisados utilizando-se *primers* descritos segundo LINTON et al. (2000) e WASSENAAR et al. (2002), respectivamente. Todas as reações de amplificação foram realizadas utilizando 12,5 µL de 2x GoTaq® Colorless Master Mix (Promega®), 10 pmol de cada *primer*, 10 ng de DNA genômico e água ultrapura para um volume final de 25 µL. *Campylobacter jejuni* 104 (GenBank CP023343) e *Campylobacter jejuni* 100 (GenBank CP023446) foram utilizados como controles positivos para *cgtB* e *wlaN*, respectivamente. Além disso, foi incorporada uma mistura sem adição de DNA como controle da reação. Para as reações de amplificação, utilizou-se o PTC-100® *Peltier Thermal Cycler* (MJ Research), sendo submetidas a 35 ciclos de desnaturação a 95 °C por 1 min, anelamento em temperatura específica para cada par de iniciadores por 1 min e extensão a 72 °C por 1 min. Os produtos de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1,5% e corados com Blue Green *loading dye* (LGC Biotecnologia®), sendo visualizados sob luz UV. As sequências de *primers*, tamanhos dos fragmentos esperados e temperaturas de anelamento são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Protocolos utilizados para detecção de genes envolvidos na biossíntese de lipo-oligossacarídeos de *Campylobacter jejuni*

Gene	Sequência do <i>primer</i> (5' → 3')	Produto (pb)	Temperatura de anelamento (°C)
<i>cgtB</i>	TTAAGAGCAAGATATGAAGGTG GCACATAGAGAACGCTACAA	561	58
<i>wlaN</i>	TGCTGGGTATACAAAGGTTGTG AATTTTGGATATGGGTGGGG	330	60

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 205 isolados de *C. jejuni*, 175 (85,4%) carregavam, pelo menos, um dos genes avaliados. Setenta e três (35,6%) isolados portavam o gene *cgtB* e 103 (50,2%) eram portadores do gene *wlaN*. Dentre os isolados de granja, nenhum carregava o gene *cgtB*, porém todos (100%) portavam o gene *wlaN*. Dentre os isolados de abatedouro, o gene *cgtB* foi detectado em 42 (47,7%) e o gene *wlaN*

em 46 (52,3%). Quanto aos isolados de carne de frango, 31 (34,8%) carregavam o gene *cgtB* e 29 (32,6%) eram portadores do gene *wlaN* (Figura 1).

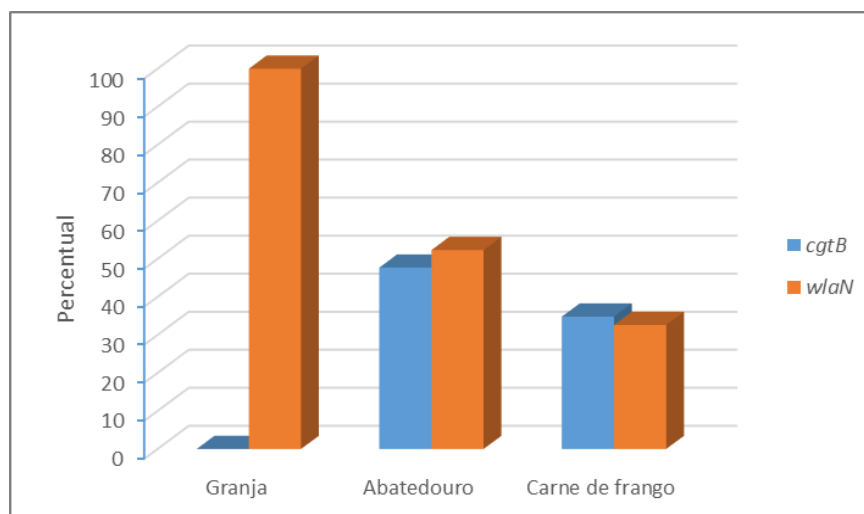


Figura 1. Percentual de isolados de *Campylobacter jejuni* portadores dos genes *cgtB* e *wlaN*

KORDINAS et al. (2005) pesquisaram 356 *C. jejuni* isolados de casos clínicos de campilobacteriose humana, e detectaram os genes *cgtB* e *wlaN* em 24,4% e 16,0% dos isolados, respectivamente. Dentre os isolados positivos para *cgtB*, cinco (1,4%) estavam associados à GBS e sua variante, a Síndrome de Muller-Fischer. Em estudo realizado por KHOSHBAKHT et al. (2013) em *C. jejuni* provenientes de fezes de frango, os genes *cgtB* e *wlaN* foram detectados em 29,2% e 83,3% dos isolados, respectivamente. Além disso, dez isolados apresentaram os dois genes concomitantemente.

Neste estudo, os isolados provenientes de granja que portavam o gene *wlaN* não continham o gene *cgtB*. De forma semelhante, os isolados provenientes de abatedouro que continham o gene *wlaN* não carregavam o gene *cgtB*, bem como, os isolados positivos para o gene *cgtB* eram negativos para o gene *wlaN*. Quanto aos isolados oriundos de carne de frango, apenas 4 carregavam os dois genes pesquisados. De acordo com LINTON et al. (2000), *cgtB* e *wlaN* pertencem ao mesmo *locus* genético e são alelos diferentes do mesmo gene, sendo o nível global de identidade de aminoácidos entre as duas sequências de 58,4% (LINTON et al., 2000). Os produtos genéticos de *cgtB* e *wlaN* identificados por PCR não são conhecidos por regiões conservadas, podendo haver resultados falso-negativos devido a pequenas mudanças de nucleotídeos (KORDINAS et al., 2005). A sequência do genoma de *C. jejuni* revela muitas sequências hipervariáveis (PARKHILL et al., 2000) e o *locus* relacionado à biossíntese de LOS é uma das regiões altamente variáveis no genoma de *C. jejuni* (MULLER et al., 2007). Deste modo, a utilização de dois conjuntos de *primers* em nosso estudo objetivou reduzir os índices de resultados falso-negativos, mas os resultados ainda podem estar subestimados.

Estudos sugerem uma correlação entre a ocorrência de uma  $\beta$ -1,3 galactosiltransferase codificada por *cgtB* ou *wlaN* em cepas de *C. jejuni* e sua forte capacidade de colonização e invasão (MULLER et al., 2007). Portanto, os isolados de *C. jejuni* que portavam, pelo menos, um dos genes pesquisados, podem ser classificados como potencialmente invasivos e possíveis causadores de complicações pós-infecciosas, como a GBS.

#### 4. CONCLUSÕES

A maioria dos isolados de *C. jejuni* provenientes da cadeia produtiva de frangos do Rio Grande do Sul apresentou potencial invasivo e, portanto, o consumo de carne de frango comercializada no estado representa riscos de campilobacteriose com possível desenvolvimento de complicações pós-infecciosas, como a GBS.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

GILBERT, M., BRISSON, J.-R., KARWASKI, M.-F., MICHNIEWICZ, J., CUNNINGHAM, A.-M. et al. Biosynthesis of ganglioside mimics in *Campylobacter jejuni* OH4384: identification of the glycosyltransferase genes, enzymatic synthesis of model compounds, and characterization of nanomole amounts by 600-MHz  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR analysis. **The Journal of Biological Chemistry**, v.275, n.6, p.3896-3906, 2000.

KHOSHBAKHT, R.; TABATABAEI, M.; HOSSEINZADEH, S.; SHEKARFOROUSH, S.S.; ASKI, H.S. Distribution of nine virulence-associated genes in *Campylobacter jejuni* and *C. coli* isolated from broiler feces in Shiraz, Southern Iran. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.10, n.9, p.764-770, 2013.

KOOLMAN, L.; WHYTE, P.; BURGESS, C.; BOLTON, D. Distribution of virulence-associated genes in a selection of *Campylobacter* isolates. **Foodborne Pathogens and Diseases**, v.12, p.424-432, 2015.

LINTON, D.; GILBERT, M.; HITCHEN, P.G.; DELL, A.; MORRIS, H.R. et al. Phase variation of a b-1,3 galactosyltransferase involved in generation of the ganglioside GM1-like lipo-oligosaccharide of *Campylobacter jejuni*. **Molecular Microbiology**, v.37, n.3, p.501-514, 2000.

MULLER, J.; MEYER, B.; HÄNEL, I.; HOTZEL, H. Comparison of lipooligosaccharide biosynthesis genes of *Campylobacter jejuni* strains with varying abilities to colonize the chicken gut and to invade Caco-2 cells. **Journal of Medical Microbiology**, v.56, p.1589-1594, 2007.

PARKHILL, J.; WREN, B.W.; MUNGALL, K.; KETLEY, J.; CHURCHER, C. et al. The complete genome sequence of the food borne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals hypervariable sequences associated with surface structures. **Nature**, v.403, p.665-669, 2000.

WASSENAAR, T.M.; WAGENAAR, J.A.; RIGTER, A.; FEARNLEY, C.; NEWELL, D.G.; DUIM, B. Homonucleotide stretches in chromosomal DNA of *Campylobacter jejuni* display high frequency polymorphism as detected by direct PCR analysis. **FEMS Microbiology Letters**, v.212, p.77-85, 2002.

YUKI, N. Molecular mimicry between gangliosides and lipopolysaccharides of *Campylobacter jejuni* isolated from patients with Guillain-Barré syndrome and Miller-Fisher syndrome. **The Journal of Infectious Diseases**, v.176 (Suppl. 2):S150-S153, 1997.