

## PESQUISA DE *Campylobacter* EM FÍGADO DE FRANGO E PRESENÇA DOS GENES *cdt*

CUNHA, Charlene Carvalho<sup>1\*</sup>; SILVA, Daiani Teixeira<sup>1</sup>; TEJADA, Tejada Schneid<sup>1</sup>; TIMM, Cláudio Dias<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal, Faculdade de Veterinária -Universidade Federal de Pelotas

\*cha.cunha@hotmail.com

### 1. INTRODUÇÃO

*Campylobacter* é uma bactéria Gram negativa encontrada geralmente na forma espiralada. Não forma esporos, é sensível ao oxigênio, calor, pH ácido, dessecamento e desinfetantes (FDA, 2009). Este micro-organismo é o agente etiológico da campylobacteriose no homem, uma doença transmitida por alimentos, que causa gastroenterite, tendo como sintomas, diarreia, cólicas abdominais e febre. *Campylobacter* é uma bactéria endêmica de países em desenvolvimento, onde a frequência de casos assintomáticos é elevada (FRANCO & LANDGRAF, 2003).

*Campylobacter* é também causador de duas síndromes raras, a Síndrome Hemolítica Urêmica, que atinge principalmente indivíduos com a saúde debilitada, e a Síndrome de Guillain-Barré, na qual o sistema imune ataca parte do sistema nervoso periférico causando paralisia muscular (FDA, 2009). A principal espécie envolvida nos casos de campylobacteriose é *C.jejuni* e seguido de *C.coli* (Kuana et al., 2009).

As aves são portadores assintomáticos e servem como reservatório da bactéria (em seus tratos intestinais), podendo ocorrer assim a contaminação dos produtos de frango durante o abate e o processamento na indústria, o que faz desses produtos a principal fonte de contaminação alimentar para o homem.

Um dos principais fatores de virulência produzido por este micro-organismo é a toxina citolética distensiva (CDT), que é responsável pelo agravamento dos sintomas de diarreia e cólicas abdominais (JAIN et al., 2007).

Este trabalho teve como objetivo verificar a presença de *Campylobacter* em fígados de frango e verificar a presença dos genes *cdt* nos isolados.

### 2. MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletadas 40 amostras de fígado de frango no comércio na região sul do estado do Rio Grande do Sul. Essas amostras foram encaminhadas ao laboratório acondicionadas em caixas térmicas com gelo, mantidas em suas embalagens originais.

Os fígados de frangos foram massageados, durante 2 min, em sacos plásticos estéreis contendo 50 mL de Caldo Brucella (Acumedia, Lansing, Michigan, USA). Uma alíquota deste caldo foi semeada na superfície de Columbia Blood Agar Base (Himedia, Mumbai, India) contendo 0,4% de carvão ativado, 5% de suplemento FBP (solução redutora de oxigênio, que torna o meio de cultura favorável ao crescimento de *Campylobacter*) e 1% de suplemento Campylobacter I (Blaser – Wang) (Himedia) para controlar o crescimento da microbiota acompanhante, e incubada a 42°C por 48 horas em atmosfera de microaerofilia.

As colônias típicas com brilho d'água e espreiadas foram analisadas morfotintorialmente pela coloração de Gram. As colônias das culturas puras suspeitas de *Campylobacter* foram raspadas da superfície do ágar e criopreservadas em meio estoque (glicerol 25 mL, neopeptona 1 g, NaCl 0,5 g, água destilada 75 mL). Os isolados foram recuperados em ágar Columbia a 42°C por 48 horas, em microaerofilia, quando necessário.

A confirmação dos isolados suspeitos foi realizada através da técnica da Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR). O DNA foi extraído com *kit* comercial Illustra Bacterial Genomic PREP Mini Spin (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK), de acordo com as recomendações do fabricante, a partir de um *pellet* de colônias obtido diretamente das placas. O DNA foi analisado através da técnica multiplex PCR para diferenciar entre as espécies *C. jejuni* e *C. coli* (HARMON et al., 1997).

Após a identificação de espécies, foi feita a pesquisa de genes de virulência através da técnica de multiplex PCR, de acordo com Martinez et al. (2006).

Para análise das ampliações, foi utilizada a técnica de eletroforese em gel de agarose a 1,5%. Na visualização das bandas, foi utilizado GelRed (Uniscience, São Paulo, Brasil) como uma opção segura para substituição do brometo de etídeo, visto que não é citotóxico ou mutagênico.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 40 amostras de fígado de frango analisadas, foram isolados *Campylobacter spp.* em 15 amostras (37,5%). Devido à dificuldade de cultivo da bactéria, não foi possível obter material de 4 isolados para a realização de análises moleculares.

Dos 11 isolados analisados, nove foram identificados como *C. jejuni* (81,8%), sendo que todos apresentaram os genes *cdt*. Os outros dois isolados foram identificados como *C. coli* (18,2%), que não apresentaram os genes *cdt*.

A ocorrência de *C. jejuni* em fígado de frango tem sido relatada em outros estudos, como Carvalho et al. (1997) que relataram o isolamento em 54% das amostras estudadas e Castro et al. (1997) que observaram 10% das amostras analisadas contaminadas.

Os fígados de frangos que apresentaram a presença de *Campylobacter* foram contaminados possivelmente durante a etapa de evisceração das carcaças, devido a falhas no processamento, levando em conta a proximidade do fígado com o trato gastrointestinal e/ou através de contaminação cruzada.

Outros estudos encontraram os genes *cdt* em *C. jejuni* isolados de carcaças de frangos (BANG et al., 2001; ROZYNEK et al., 2005), o que confirma o fato de os genes *cdt* serem comumente encontrados em *C. jejuni*.

Embora a capacidade da bactéria penetrar nas células intestinais independa da produção da toxina CDT (Young et al., 2007), o risco para o consumidor está aumentado quando da ocorrência de cepas portadoras dos genes *cdt*, pois a intensidade da patologia da enfermidade será exacerbada.

### 4. CONCLUSÃO

A ocorrência de *Campylobacter jejuni* identificado nas amostras de fígado de frango analisadas salientam o risco a saúde dos consumidores, visto que estes isolados apresentam potencial para a produção da toxina CDT.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BANG, D.D.; SCHEUTZ, F.; AHRENS, P.; PEDERSEN, K.; BLOM, J.; MADSEN, M. Prevalence of cytolethal distending toxin (*cdt*) genes and CDT production in *Campylobacter* spp. isolated from Danish broilers. **Journal of Medical Microbiology**, v. 50, p. 1087-1094, 2001.
- CARVALHO, A. C. F. B.; SCHOCKEN-ITURRINO, R. P.; CAMA, L. F. S. A. M. Isolation of *Campylobacter jejuni* from viscera and bile secretion of broiler chickens with diarrhea. **Revista de Microbiologia**, v. 28, n. 2, p. 125- 128, 1997.
- CASTRO, A. G. M., GENOVEZ, M. E., SCARELLI, E., TORRES, A. P., CARDOSO, M.V., PASCOAL, A. L. S., SOUZA, C. A. I., CARRASCO, S. Monitoramento de *Campylobacter* spp ao longo da linha de abate de frangos de corte. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 64, n. 2, p. 21-26, 1997.
- FOOD AND DRUG ADMINISTRATION [FDA]. Department of Health and Human Services. *Campylobacter jejuni*. In: **Bad Bug Book: Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook**, 2009. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/FoodSafety/FoodborneIllness/FoodborneIllnessFoodbornePathogensNaturalToxins/BadBugBook/ucm070024.htm>> Acesso em 10 de jul. de 2012.
- FRANCO, B.D.G.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2003.
- 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.
- 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.
- KUANA, S.L.; SANTOS, L.R.; RODRIQUES, L.B.; NASCIMENTO, V.P. Sistema API Campy para caracterização de amostras de *Campylobacter* isoladas de descarga cecal, fezes, swabs cloacais, e carcaças de frango de corte. **Arq. Inst. Biol.**, v. 76, n. 2, p. 273-277, 2009.
- POWELL, L.F.; LAWES, J.R.; CLIFTON-HADLEY, F.A.; RODGERS, J.; HARRIS, K.; EVANS, S.J.; VIDAL, A. The prevalence of *Campylobacter* spp. in broiler flocks and on broiler carcasses, and the risks associated with highly contaminated carcasses. **Epidemiology & Infection**. v. 16, p1-14, 2012.
- ROZYNEK, E.; DZIERZANOWSKA-FRANGRAT, K.; JOZWIAK, P.; POPOWSKI, J.; KORSKAK, D. DZIERZANOWSKA, D. 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**, v. 54, p. 615-619, 2005.

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