

## ISOLAMENTO DE *Campylobacter* DE FEZES DE HUMANOS

**PRISCILA ALVES DIAS<sup>1</sup>; DAIANI TEIXEIRA DA SILVA<sup>1</sup>; TALITA SCHNEID TEJADA<sup>1</sup>; CHARLENE CARVALHO DA CUNHA<sup>1</sup>; CLÁUDIO DIAS TIMM<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Veterinária Preventiva, Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal, Universidade Federal de Pelotas  
[pipizinha\\_vet@hotmail.com](mailto:pipizinha_vet@hotmail.com)

### 1. INTRODUÇÃO

*Campylobacter* é um patógeno capaz de causar enterites em humanos em todo o mundo. Apesar de muitos casos não serem diagnosticados, a enfermidade afeta mais de 2 milhões de pessoas por ano (CDC, 2010a). No Brasil, em estudo realizado em Recife, LIMA et al. (1993) isolou *Campylobacter* de 12% de crianças com diarreia. Uma em cada 100 pessoas com campilobacteriose desenvolve a Síndrome de Guillain-Barré, na qual o sistema imune ataca parte do sistema nervoso periférico causando paralisia muscular (FDA, 2009). A maioria dos casos de infecção é originária da ingestão de carne de aves domésticas (MAGNÚSSON et al., 2011) e a principal espécie envolvida é *C. jejuni*, seguido de *C. coli* (CDC, 2010b).

Um dos principais fatores de patogenicidade responsável pelos sintomas de diarreia e cólicas abdominais em humanos é a toxina citotética distensiva (CDT). Esta toxina é composta por subunidades proteicas codificadas pelos genes *cdtA*, *cdtB* e *cdtC* e afeta as células epiteliais, causando distensão e morte celular (YOUNG et al., 2007).

Este trabalho teve como objetivo verificar a presença de *Campylobacter* em fezes de humanos e pesquisar a presença dos genes *cdtA*, *cdtB* e *cdtC* nos isolados.

### 2. MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas 100 amostras de fezes de humanos coletadas de material enviado a laboratórios de análises clínicas para análise parasitológica na região sul do estado do Rio Grande do Sul. As amostras foram coletadas com o uso de zaragatoas estéreis e encaminhadas ao laboratório em meio de transporte Cary Blair (Himedia, Mumbai, Índia) em caixas isotérmicas com gelo.

O material das zaragatoas foi semeado diretamente na superfície de ágar Columbia Blood Agar Base (Himedia, Mumbai, Índia), adicionado de 0,4% (m/v) de carvão ativado, 5% (m/v) de suplemento FBP (GEORGE et al., 1978) e 1% (m/v) de mistura de antibióticos para controlar o crescimento da microbiota acompanhante. A incubação foi feita a 42°C por 48 horas em atmosfera de microaerofilia, gerada através de uma modificação sugerida por FILGUEIRAS e HOFER (1989) da técnica de passivação do cobre descrita por ATTEBERY e FINEGOLD (1970).

As colônias características foram analisadas pela coloração de Gram. Os isolados com morfologia típica de bastonetes delgados, em forma de S ou de asa de gaivota foram testados para a presença das enzimas catalase e oxidase. Estas enzimas estão sempre presentes nas espécies termofílicas, que são as causadoras de processos entéricos em humanos. Quando, após a incubação, não foram obtidas culturas puras, as colônias foram raspadas da superfície do ágar e, após suspensão

em solução salina a 0,85%, foram filtradas em filtro de 0,45 µm (Sartorius Stedim Biotech, Goettingen, Germany) e novamente cultivadas.

As culturas suspeitas de *Campylobacter* foram 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*, de acordo com protocolo descrito por HARMON et al. (1997). Foram utilizados dois pares de *primers*, o par I (pg 3 e pg 50) amplifica um fragmento de 460 pb de uma região altamente conservada relacionada aos genes da flagelina, tanto para *C. jejuni* como para *C. coli*. O par II amplifica uma região específica somente presente em *C. jejuni*, apresentando um fragmento de 160 pb. Como controle positivo, foi utilizada a cepa *C. jejuni* ATCC 33291 e a cepa *C. coli* CCAMP1003 cedida pelo setor de *Campylobacter* do Instituto Oswaldo Cruz do Rio de Janeiro. Na análise das ampliações, foi utilizada a técnica de eletroforese em gel de agarose a 1,5%. Para visualização das bandas foi utilizado GelRed (Uniscience, São Paulo, São Paulo, Brasil), que se liga ao DNA da amostra e emite fluorescência na presença de luz ultravioleta.

A pesquisa de genes de virulência, feita após a identificação das espécies, foi realizada através da técnica de PCR multiplex, de acordo com MARTINEZ et al. (2006). O tamanho das bandas esperadas foram de 422 pb, 531 pb e 339 pb para os genes *cdtA*, *cdtB* e *cdtC*, respectivamente. Para análise do produto amplificado foi utilizada mesma técnica já descrita anteriormente.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

*Campylobacter* foi isolado de três (3%) amostras de fezes de humanos. Um isolado, de uma mulher de 31 anos, foi identificado como *C. jejuni*, positivo para a presença dos genes *cdtA*, *cdtB* e *cdtC*. Não foi possível identificar os outros dois isolados devido a dificuldades de cultivo.

A maior incidência de campilobacteriose ocorre em crianças abaixo de 2 anos de idade (JOFRE e ESPINOZA, 2008), porém, em nosso estudo as idades das pessoas portadoras foram 1, 4 e 31 anos. Em estudo realizado por QUERTZ et al. (2010) com crianças de 2 a 36 meses, foram isolados *Campylobacter* de 10,6% das crianças que apresentaram diarreia e de 8,4% das crianças sem sintomatologia. Em nosso estudo, duas das três pessoas que albergavam *Campylobacter* tinham idade inferior a 5 anos, entretanto a ocorrência de *C. jejuni* em um adulto é indicativo da importância que indivíduos dessa faixa etária podem ter na epidemiologia da campilobacteriose.

Em Santa Catarina (SC), uma pesquisa mostrou que 6,2% da população de adultos pode ser portadora assintomática de *Campylobacter* (TOSIN e MACHADO, 1995). Nos Estados Unidos, no período de 1996 a 1998, a incidência de *Campylobacter* variou entre 21,4-25,2% (SAMUEL et al., 2004). A ocorrência encontrada em humanos no Brasil pode ser considerada baixa, quando comparada a estudos desenvolvidos em outros países. É possível que os resultados observados

no estudo realizado em SC e no presente trabalho se devam à sensibilidade das cepas isoladas aos antibióticos utilizados nos meios de cultivo seletivo, ou ainda, que a exposição à bactéria quando criança possa fazer com que o organismo produza anticorpos específicos contra *Campylobacter*, diminuindo assim a infecção em indivíduos adultos.

Mais de 80% das campilobacterioses alimentares são causadas por *C. jejuni* (FDA, 2012), sendo a maioria capaz de produzir a toxina letal distensiva (CDT) (MARTINEZ et al., 2006). Embora a capacidade da bactéria de provocar doença não dependa da produção da toxina, o fato do *C. jejuni* isolado possuir os genes *cdt* pode ser um agravante para patogenicidade da enfermidade.

#### 4. CONCLUSÕES

A ocorrência de *Campylobacter* em fezes de humanos é baixa no sul do Brasil. *C. jejuni* é a espécie predominante, sendo que a cepa isolada apresentou potencial para produção da toxina CDT.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ATTEBERY, H.R.; FINEGOLD, S.M. A miniature anaerobic jar for tissue transport or for cultivation of anaerobes. **American Journal of Clinical Pathology**, n. 53, p. 383-388, 1970.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION [CDC]. National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases. **Campylobacter, General information**, 2010a. Acessado em 17 jul. 2012. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/nczved/divisions/dfbmd/diseases/campylobacter/>>

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION [CDC]. National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases. **Campylobacter, Technical information**, 2010b. Acessado em 17 de jul. 2012. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/nczved/divisions/dfbmd/diseases/campylobacter/technical.html>>

FILGUEIRAS, A.L.L.; HOFER, E. Ocorrência de *Campylobacter* termofilico em diferentes pontos de uma estação de tratamento de esgotos na cidade do Rio de Janeiro. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, n. 20, p. 303-308, 1989.

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. Acessado em 17 de jul. 2012. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/FoodSafety/FoodborneIllness/FoodborneIllnessFoodbornePathogensNaturalToxins/BadBugBook/ucm070024.htm>>

GEORGE, H.A.; HOFFMANN, P.S.; KRIEG, N.R.; SMIMBERT, R.M. Improved media for growth and aerotolerance of *Campylobacter fetus*. **Journal of Clinical Microbiology**, n. 8, p. 36-41. 1978.

HAMON, K.M.; RANSOM, G.M.; WESLEY, I.V. Differentiation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by polymerase chain reaction. **Molecular and Cellular Probes**, n. 11, p. 195-200, 1997.

JOFRE, K.J.M.; ESPINOZA, C.P. **Prevalencia de especies de *Campylobacter spp.* em niños menores de 10 años com diarrea aguda en la ciudad de Talca**, 2008. Acessado em 17 de jul. 2012. Disponível em: <<http://dspace.otalca.cl/handle/1950/5697>>

LIMA, N.V.; FIGUEIREDO, A.C.T. A.; PRADO, A.D.; FILGUEIRAS, A.L.L.; HOFER, E. *Campylobacter* e outros enteropatógenos em processos diarreicos infantis no Recife, Pernambuco. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 25, n. 3, p. 71-74, 1993.

MAGNÚSSON, S.H.; GUOMUNDSDÓTTIR, S.; REYNISSON, E.; RÚNARSSON, Á.R.; HAROARDÓTTIR, H.; GUNNARSON, E.; GEORGSSON, F.; REIERSEN, J.; MARTEINSSON, V.T. Comparison of *Campylobacter jejuni* isolates from human, food, veterinary and environmental sources in Iceland using PFGE, MLST and *fla*-SVR sequencing. **Journal of Applied Microbiology**, n. 4, p. 971-981, 2011.

MARTINEZ, I.; MATEO, E.; CHURRUCA, E.; GIRBAU, C.; ALONSO, R.; ASTORGA, A.F. Detection of *cdtA*, *cdtB*, and *cdtC* genes in *Campylobacter jejuni* by multiplex PCR. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 296, p. 45-48, 2006.

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.

QUERTZ, J.S.; LIMA, I.F.N.; HAVT, A.; et al. *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in children from communities in Northeastern Brazil: molecular detection and relation to nutritional status. **Diagnostic Microbiology Infectious Disease**, v. 67, p. 220-227, 2010.

ROSENQUIST, H.; SOMMER, H.L.; NIELSEN, L.N.; CHRISTESEN, B.B. The effect of slaughter operations on the contamination of chicken. **International Journal of Food Microbiology**, v. 108, p. 226-232, 2006.

SAMUEL, M.C.; VUGIA, D.J.; SHALLOW, S.; et al. Epidemiology of sporadic *Campylobacter* infection in the United States and declining trend in incidence, FoodNet 1996-1999. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, n. 3, p. 165-174, 2004.

TOSIN, I.; MACHADO, R.A.; Ocorrência de *Campylobacter spp.* entre manipuladores de alimentos em cozinhas hospitalares de localidade urbana da Região Sul do Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 29, n. 6, p. 472-477, 1995.

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