

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

PODER DISCRIMINATÓRIO DAS TÉCNICAS DE RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) e PFGE (*Pulsed-field gel electrophoresis*) PARA DIFERENCIAR *Campylobacter jejuni* ISOLADAS DE CARCAÇAS DE FRANGOS

PHELIPE AUGUSTO BORBA MARTINS PERES

**DAISE APARECIDA ROSSI
FAMEV**

**UBERLÂNDIA – MG
DEZEMBRO 2017**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

PODER DISCRIMINATÓRIO DAS TÉCNICAS DE RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) e PFGE (*Pulsed-field gel electrophoresis*) PARA DIFERENCIAR *Campylobacter jejuni* ISOLADAS DE CARCAÇAS DE FRANGOS

Trabalho de conclusão de curso
apresentado como requisito para a
aprovação na disciplina Iniciação à
Pesquisa do Curso de Ciências
Biológicas – Bacharelado da
Universidade Federal de Uberlândia.

Prof^a Dr^a Celine de Melo
Coordenadora do Curso

**UBERLÂNDIA – MG
DEZEMBRO DE 2017**

“Eu deixei meu coração escolher o caminho”

ADELE Laurie Blue Adkins

Aos meus pais, minha irmã e todos os meus
grandes amigos, pelo apoio que sempre me
foi dado ao longo da minha vida acadêmica.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho é resultado de muitos sonhos da cabeça de um jovem que sonhava em ser um grande pesquisador, que no ensino médio era incentivado por seus professores a continuar correndo atrás de seus sonhos.

Na faculdade procurei sempre encontrar coisas novas para aprender procurei incansavelmente encontrar uma linha de pesquisa que procurava desde o ensino médio, mas acabei mudando um pouco minha concepção ao perceber que para ser um pesquisador não era tão fácil, pois ainda enfrentaria diversos obstáculos.

Encontrei diversos obstáculos ao iniciar a realização de dois cursos ao mesmo tempo, não morando na minha atual cidade, dormindo pouquíssimas horas por dia, mas nesse trajeto encontrei diversas pessoas que me auxiliaram e fizeram ser possível a realização de todas as etapas.

Agradeço a Deus que nos momentos difíceis era sempre meu suporte supremo, que nunca me deixou na mão, esteve sempre ao meu lado em todos os momentos, agradeço por tudo.

Agradeço aos meus pais e meus avós e meus familiares por sempre me apoiarem, apesar dos conselhos que as vezes eram diferentes dos meus sonhos, por terem ajudado a construir os meus valores e por contribuírem para ser quem sou hoje, sou forte graças a vocês.

À minha “maninha” em especial que esteve sempre ao meu lado, sempre preocupada comigo ligando todos os dias, aturando em todas as minhas explicações, acho que de tudo que eu aprendi em microbiologia pelo menos 50% ela conseguiu absorver. Obrigado por me aceitar assim, do jeito que sou sem nunca me questionar.

Agradeço a minha segunda família, que me acolheu tão bem e que me fez crescer a cada dia, família LABIO. Agradeço especialmente a minha grande “mami” Prof^a Dr^a Daise Aparecida Rossi, que de idosa não tem nada, peço perdão por isso até hoje, mas que pra mim foi mesmo uma segunda mãe. Obrigado por me acolher e aturar me aceitando com todas minhas

histórias e por me ensinar tantas coisas, que nunca nem sonhei que aprenderia tanto com uma grande pesquisadora que conheço, tenho orgulho por ser seu orientado, agradeço por todos seus conselhos que me ajudaram tanto na construção de quem eu sou.

Agradeço ao meu grande amigo-irmão (GUI) vulgo Guilherme, que sinceramente tenho muito a agradecer a Deus por ter colocado você em minha vida, por todas as horas que passamos juntos, por todos os conselhos, e por ter me ajudado em momentos tão difíceis da minha vida, que necessitava de alguém para compartilhar tudo que passava-se em minha mente, foi meu verdadeiro psicólogo particular e que me ajudou em tudo no laboratório sempre que precisei, me espelho também em você, e espero ainda ter sua amizade por muitos anos.

Quero agradecer também as minhas “migas” de coração Eliane (Lili) e Roberta (Rob), que são verdadeiras pesquisadoras de excelência que me ensinaram também tudo o que eu sei sobre *Salmonella* e *Campylobacter*, que me fizeram apaixonar a cada dia pela pesquisa, mostrando com sua seriedade e descontração nos momentos certos, a ser um grande profissional, devo tudo a vocês também, agradeço por todos os conselhos e por ouvirem também todas as minhas histórias, um dia ainda quero ser igual a vocês.

Ainda na família do LABIO quero agradecer ao Marcelo, grande profissional que nos meus primeiros passos no laboratório, me ensinou tudo o que eu precisava para continuar seguindo as próximas etapas, agradeço também pelo serviço de “consultor financeiro particular”, que sempre foi muito rigoroso em seus conselhos. Agradeço também a Tchesca pelo jeito rigoroso de ensinar, mas que sempre preocupou muito comigo quando estava preocupado com tantas coisas na vida, sempre me aconselhando em tudo que fazia em minha vida. Agradeço toda família LABIO como a Renatinha que agora está tão longe, mas que me acompanhou tanto em minhas jornadas Araguari/Uberlândia e que tenho um carinho imenso, a Silvia também por todos os conselhos e broncas, Profª Drª Bia por estar sempre de bom humor, para ouvir minhas histórias e me aconselhar, nem sempre conselhos muito bons, brincadeira, trazendo verdades

que precisava escutar e por confiar tanto em mim. Agradeço também a todos os outros alunos de iniciação científica, que sempre trabalhando e aprendendo juntos, Edson, Pedro, Priscilla, Jéssica, Otávio, minhas companheiras do mestrado Jocasta, Marcela, Paula e Thais.

Agradeço especialmente ao Prof^r Dr^r Deivid William Fonseca Batistão, que com seu carisma e inteligência extremos me ajudou, sempre conseguindo um tempo de me atender em sua sala para resolver os problemas do trabalho, e principalmente por aceitar compor esta banca.

Aos meus grandes amigos também da graduação, Gabriela, Larissa, Nayara, Gustavo, Ângelo, Marcos, ao Leandro da Coordenação do Curso que me auxiliou em toda minha graduação avisando sobre todas as obrigações e dúvidas, enfim que sempre acreditaram em mim e tantos outros que nessa graduação me marcaram de alguma forma.

Ao meu amigo Felipe Rods, que nessa etapa de finalização me aturou em meus momentos de mau humor e que me acompanha, às vezes horas, no laboratório descontraindo o ambiente.

Ao CNPq, FAPEMIG e CAPES pelas bolsas de estudo concedidas e pelo apoio financeiro para o desenvolvimento de toda a pesquisa.

Finalizando agradeço a todos, que talvez tenham faltado nomes aqui, mas que sem vocês nada disso seria possível.

Muito obrigado a todos.

RESUMO

Campylobacter jejuni é reconhecido como principal agente causador de gastroenterite de origem alimentar nos EUA e na Europa. A carne de frango representa o principal veículo de transmissão da doença aos humanos. Uma das maneiras de avaliar epidemiologicamente o micro-organismo são as técnicas de genotipagem como o PFGE e o RAPD, porém são poucos os estudos que comparam as técnicas em relação à eficiência na discriminação das cepas. Objetivou-se avaliar a similaridade genética de 44 cepas de *C. jejuni* isoladas de carcaças de frangos de estabelecimento sob sistema de inspeção federal (SIF). As amostras isoladas foram genotipadas pelos métodos PFGE utilizando a enzima *SmaI* e RAPD utilizando os *primers* 1290 e *HLWL*, isoladamente e em conjunto, para a posterior fotodocumentação para análise computacional, totalizando quatro dendrogramas. As análises dos dendrogramas formados basearam-se na comparação dos perfis distintos, *clusters* e clones formados. Os resultados obtidos mostraram que foram identificados oito perfis distintos e apenas um *cluster*/pulsotipo em comum para os quatro testes. As demais cepas apresentaram comportamento totalmente diferenciado, tornando difícil a comparação entre RAPD e PFGE. Além disso, ficou evidente que o *primer* 1290 não apresenta bom poder discriminatório, comprovando a necessidade de utilização de mais de um *primer* nessa técnica. De maneira geral, o RAPD apresentou maior poder discriminatório, porém vale considerar que a técnica apresenta baixa reprodutibilidade e que o PFGE é amplamente reconhecido como padrão-ouro.

Palavras-chaves: Avicultura, Campilobacteriose, Tipagem Molecular, Dendrograma.

ABSTRACT

Campylobacter jejuni is recognized as the main agent that causes foodborne gastroenteritis in the US and Europe. Chicken meat is the main vehicle of transmission of disease to humans. One of the ways to epidemiologically evaluate the microorganism are the genotyping techniques such as PFGE and RAPD. However, there are few studies comparing techniques in terms of discrimination efficiency of the strains. The aim of this study was to evaluate the genetic similarity of 44 strains of *C. jejuni* isolated from carcasses of broiler chickens under system of federal inspection (SFI). The isolated samples were genotyped by the PFGE methods using the *SmaI* enzyme and RAPD using primers 1290 and HLWL, alone and combined, for the subsequent photodocumentation for computational analysis, totalizing four dendrograms. The analyzes of the dendrograms formed were based on the comparison of the different profiles, pulses/clusters and clones formed. The results showed that eight distinct profiles and only one cluste/pulsetype in common were identified for the four tests. The other strains showed totally different behavior, making it difficult to compare RAPD and PFGE. In addition, it became clear that primer 1290 does not show good discriminatory power, proving the need to use more than one primer in this technique. In general, the RAPD presented greater discriminatory power, but it is worth considering that the technique has low reproducibility and that PFGE is widely recognized as a gold standard.

Keywords: Aviculture, Campylobacteriosis, Molecular Typing, Dendrogram.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	01
2. MATERIAL E MÉTODOS	04
2.1. Amostras	04
2.2. Tipagem Molecular.....	05
2.2.1. PFGE (<i>Pulsed-field gel electrophoresis</i>)	05
2.2.2. RAPD (<i>Random Amplified Polymorphic DNA</i>).....	08
2.3. Comparação das técnicas	10
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	10
4. CONCLUSÃO	15
PERSPECTIVAS FUTURAS.....	15
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	16

1. INTRODUÇÃO

A posição de destaque da avicultura brasileira, classificada como segundo maior produtora e maior exportadora de carne de frangos do mundo, torna relevante as preocupações quanto aos padrões de qualidade e a garantia da segurança alimentar pelo consumo da carne de frango e de seus derivados (ABPA, 2017). Dessa forma, a presença de patógenos zoonóticos deve ser constantemente monitorada ao longo de toda a cadeia de produção avícola (EFSA, 2015).

Dentre os patógenos usualmente veiculados pela carne de frangos, espécies termofílicas do gênero *Campylobacter* têm merecido especial atenção pelo crescente envolvimento em casos de gastroenterites no mundo. Dentro do gênero, *C. jejuni* é considerada a espécie mais virulenta e a mais envolvida na infecção humana (EFSA, 2015).

A infecção por *Campylobacter* costuma ser leve, e quadros mais graves estão relacionados na maioria das vezes à infecção de crianças, idosos e pessoas imunocomprometidos. O aparecimento dos primeiros sintomas leva de dois a cinco dias, e incluem diarreia, dor abdominal, febre, dor de cabeça, náusea e/ou vômitos, durando de três a cinco dias. As complicações pós-infecção, podem incluir bacteremia, hepatite, pancreatite, artrite reativa, e distúrbios neurológicos, como a Síndrome de Guillain-Barré (SGB) (WHO, 2017).

A SGB é uma doença auto-imune caracterizada como uma neuropatia parálitica, que atinge inicialmente os membros inferiores causando fraqueza nas pernas, paralisias e progressão até os membros superiores que leva ao comprometimento do sistema respiratório e causa a morte por insuficiência respiratória (SEJVAR et al., 2011; SKARP et al., 2016).

As bactérias do gênero *Campylobacter* são divididas em 36 espécies e 14 subespécies, são micro-organismos gram-negativos, em formato de bacilo curvo ou espiralado, com presença de flagelo (SILVA et. al, 2011; LPSN, 2017). São bactérias fastidiosas, por exigirem condições

especiais para seu crescimento, como ambiente de microaerofilia e nutrientes específicos (GUNTHER; CHEN, 2009; JOHN et al., 2011).

Dados obtidos de órgãos de vigilância epidemiológica como a EFSA (*European Food Safety Authority*) na União Européia (UE) e o CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*) nos EUA, apontam que a campilobacteriose afeta 2,4 milhões de pessoas por ano nos EUA, e nove milhões na UE, com elevados custos associados à perdas de produtividade e com o sistema de saúde pública (CDC, 2015). No Brasil, casos e surtos de campilobacteriose são provavelmente subnotificados e classificados como “agente não identificados” (BRASIL, 2015).

Para o melhor entendimento da epidemiologia de *Campylobacter*, e consequentemente, do estabelecimento de estratégias para o seu controle, é imprescindível conhecer sua disseminação, que pode ser determinada pela relação entre diferentes cepas isoladas na cadeia de produção. Para isso, podem ser utilizadas diversas técnicas que permitem seu rastreamento, entre elas, a sorotipagem e a tipagem molecular.

Métodos fenotípicos como a sorotipagem, apesar de muito utilizados, vêm sendo substituídos por técnicas moleculares, que são consideradas mais sensíveis, específicas e discriminatórias. Entre estas técnicas, destacam-se a ribotipagem, perfil de plasmídeos, PFGE (*Pulsed-field gel electrophoresis*) e RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) (WASSENAAR & NEWELL, 2000).

O RAPD é baseado na amplificação aleatória de regiões polimórficas do DNA, não sendo necessária a informação prévia da sequência a ser amplificada para a produção do *primer*. É de rápida execução e de baixo custo quando comparada a outros métodos filogenéticos. As vantagens do RAPD incluem a universalização de *primers* para a avaliação da diversidade genética de diferentes espécies e, além disso, não há necessidade do desenvolvimento prévio

de sondas, filtros para hibridações ou sequenciamento de nucleotídeos (WILLIAMS et al., 1990).

Chuma et al. (2016) utilizaram a técnica de RAPD para avaliar a diversidade genética de 152 cepas de *Campylobacter* spp. em estudos realizados em Morogoro, município da Tanzânia. Estas cepas foram provenientes de 687 amostras de fezes e swabs cloacais de frangos e fezes de crianças menores de 5 anos, sendo 114/152 (75%) identificadas como *C. jejuni* e 38/152 (25%) como *C. coli*. O uso da técnica conseguiu agrupar os isolados em 28 clusters com 85% de homologia e determinar que 24 /152 isolados eram clones por possuírem 100% de similaridade, sendo que essas cepas eram compartilhadas entre crianças e frangos.

PFGE é uma técnica de alta reprodutibilidade, que permite a diferenciação eficiente de genótipos. Nesta técnica, o material genético é armazenado em blocos de agarose, mantendo-se intacto para a ação das enzimas de restrição (*SmaI*, *SalI*, *KpnI*, *ApaI* e *BssHII*) específicas para cada espécie, e posteriormente, é submetido a eletroforese em gel utilizando campos pulsados, que permite a separação de grandes fragmentos. É uma técnica morosa e trabalhosa, sendo os padrões variáveis de acordo com a enzima empregada, sendo necessária a correta escolha da enzima e das condições de restrição de eletroforese, que devem ser otimizadas para cada espécie (WASSENAAR; NEWELL, 2000).

Manfreda et al. (2016) utilizaram o PFGE para avaliar 123 cepas de *C. jejuni* isoladas de cecos de aves em diversas fazendas e regiões da Itália. Foram discriminados 28 pulsotipos e padrões clonais em 66,3% dos isolados, que incluíam pulsotipos comuns entre diferentes fazendas. Os autores concluíram que estes resultados, demonstraram o poder de rastreabilidade da técnica.

No Brasil, Silva et al. (2016) avaliaram a similaridade genética de isolados de *C. jejuni* e *C. coli*, de fezes de humanos, produtos avícolas e fezes de frangos por PFGE e 53,6% dos isolados apresentaram 100% de similaridade genética, sendo estes distribuídos em diferentes aviários do

sul do Brasil, detectando uma possível falha na biosseguridade epidemiológica. No estudo não foi detectada relação entre os isolados humanos.

Apesar de PFGE ser considerado o padrão ouro de tipagem bacteriana para diversos patógenos e ser o método mais utilizado pelo CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*), Taylor et al. (2013) afirmaram que o uso do PFGE apresenta um valor limitado para genotipagem de *Campylobacter*.

Assim, apesar da ampla variedade de métodos de genotipagem, de forma geral, há carência de estudos comparativos entre as diferentes técnicas para um mesmo gênero ou espécie de micro-organismo (NONGA; MUHAIRWA, 2009). A importância das técnicas de tipagem no entendimento da disseminação e fontes de contaminação ou infecção de *Campylobacter*, e sua consequente utilização nas estratégias de prevenção da infecção humana, justificam estudos que comparem o seu poder discriminatório.

Objetivou-se avaliar o poder discriminatório das técnicas RAPD e PFGE para cepas de *C. jejuni* isoladas de carcaças de frangos destinadas ao comércio interno e exportação por um frigorífico brasileiro.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Amostras

Foram utilizadas 44 estirpes previamente isoladas e identificadas como *C. jejuni* no Projeto CNPq 407924/2013-2, disponíveis na bacterioteca do Laboratório de Epidemiologia Molecular da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia. As estirpes foram isoladas de 680 carcaças de frangos beneficiadas em um frigorífico exportador com registro no SIF (Sistema de Inspeção Federal), de setembro de 2015 à fevereiro de 2016.

Para as análises, os isolados mantidos em ultra freezer foram descongelados em temperatura ambiente e reativados pelo cultivo em caldo Bolton (Oxoid ®) com 5% de sangue desfibrinado

de carneiro (Laborclin®) 37°C “*overnight*”, sob condição de microaerofilia (10% CO₂, 5% de H₂ e 85% de N₂). Posteriormente, as culturas foram semeadas em ágar CCDA (*Campylobacter Blood-free Selective Agar Base*) (Oxoid®) e incubadas a 37°C durante 48 horas em microaerofilia.

2.2. Tipagem Molecular

Os isolados foram genotipados pelas técnicas de PFGE e RAPD no Laboratório de Epidemiologia Molecular da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia.

2.2.1. PFGE (*Pulsed-field gel electrophoresis*)

Para análise de PFGE, os isolados reativados foram incluídos em *plugs*, digeridos por enzimas de restrição e submetidos a eletroforese em campo pulsado conforme protocolo recomendado pelo *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC, 2013).

As colônias previamente obtidas nas placas de CCDA foram usadas no preparo de uma suspensão bacteriana em tubos contendo 2mL de solução de NaCl 0,85% (Synth®). Com auxílio de espectrofotômetro foi determinada a absorbância a 610nm de cada suspensão celular, cujos valores foram ajustados de 0,8 - 1,0.

Para o preparo dos *plugs*, uma alíquota de 200 µL da suspensão celular foi transferida para tubos de microcentrífuga de 1,5 mL contendo 10 µL de proteinase K (20 mg/mL) (Invitrogen), sendo misturada suavemente por inversão dos tubos, de duas a quatro vezes. Ao tubo de suspensão de células foi adicionado um volume de 200 µL de 1,0% de Agarose SeaKem Gold (Lonza®) fundida em TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0), que foi homogeneizado

suavemente por pipetagem, de duas a três vezes. Após a homogeneização, 70µL da mistura foi transferida para cada poço do molde apropriado para a confecção dos *plugs* de agarose, que solidificaram à 4 °C por 5 minutos.

Os blocos de agarose já solidificados foram transferidos para tubos tipo Falcon de 50 mL, contendo 5 mL de tampão de lise celular (50 mM Tris:50 mM EDTA, pH 8,0 + 1% sarcosyl) e 0,1 mg/mL de proteinase K. A lise foi realizada incubando os tubos por 15 a 30 minutos a 54°C em banho de água com agitador orbital, com agitação constante e vigorosa de 175 a 200 rpm. Após a lise, os blocos foram lavados cinco vezes, cada lavagem durando cerca de 10 a 15 minutos com volumes de 10 a 15 mL da solução de lavagem.

Na primeira e segunda lavagem foi utilizada água ultrapura esterilizada na temperatura de 54°C. As três últimas lavagens foram realizadas com tampão TE (pH 8) a 54°C em banho de água com agitação. Após a última lavagem, o tampão TE foi descartado e 5 mL de TE a temperatura ambiente foi adicionado a cada tubo, sendo armazenados a 4°C até a etapa seguinte, da digestão enzimática.

Para obtenção dos *plugs*, os blocos foram cortados em pedaços de 2mm de largura e transferidos para um tubo contendo solução tampão de restrição 1x e incubados à temperatura ambiente durante 15 minutos. Em seguida, o tampão foi removido e 200µL da mistura da enzima de restrição contendo 40U de *Sma*I (Tabela 1) foi adicionada a cada tubo. Os *plugs* foram incubados à temperatura de 25°C por 4 horas. A mistura de restrição foi removida de cada tubo e substituída por 200µL de Tris-Borate EDTA (TBE) 0,5x. A solução foi removida e os *plugs* ficaram em repouso à temperatura ambiente durante 5 minutos.

Após a digestão e secagem, os *plugs* foram submetidos à eletroforese utilizando gel de agarose SKG (Seakem Gold) 1% em tampão TBE 0,5X, por um período de 19 horas, nas seguintes condições: 200v, ângulo de 120° com pulso inicial de 6,8 segundos e pulso final de 35,4 segundos, gradiente de 6v/cm e temperatura do tampão de 14°C.

Tabela 1. Composição da solução para digestão enzimática dos *plugs* preparados para análise PFGE.

Enzimas (<i>Sma</i>l)/(<i>Xba</i>l)	µL/plug
H2O MilliQ	174
10X “Buffer de restrição”*	20
BSA (10mg/mL)*	2
<i>Sma</i> l(40U/µL)	4
Volume Total	200

*(Invitrogen®)

Após a resolução em eletroforese, os géis foram corados em solução de brometo de etídio 0,5 mg/mL, por 30 minutos, descorados com água MilliQ por 80 minutos e examinados sob luz ultra-violeta, em transiluminador (Loccus Biotecnologia®).

A análise dos padrões obtidos nos géis pela técnica de PFGE foi realizada utilizando o coeficiente de similaridade de Dice, com tolerância de 1,5% na comparação da posição de bandas. O dendrograma foi construído com base no método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean* - agrupamento pareado não ponderado baseado na média aritmética). Estes procedimentos foram realizados por meio de análise computadorizada com o software GelCompar II (Comparative Analysis of Electrophoresis Patterns), versão 1.50, Applied Maths Korthrijk, Belgium.

2.2.2. RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*)

Para extração do DNA genômico de *C. jejuni* foi utilizado Kit comercial (Wizard® *Genomic DNA Purification Kit* – Promega), seguindo protocolo fornecido pelo fabricante. Foi adicionado 1mL de uma cultura *overnight* para um microtubo de 1,5 mL.

Em seguida, a mistura foi centrifugada a 13.000-16.000×g por 2 minutos para sedimentação das células. O sobrenadante foi removido e então adicionado 600µL de solução de lise nucleica e a mistura incubada a 80°C durante 5 minutos para promover a lise celular. Ao atingir a temperatura ambiente, foi adicionado ao lisado celular 3 µL de solução de RNase, e o tubo invertido de 2 a 5 vezes para homogeneização.

O conteúdo lisado, foi incubado a 37°C de 15 a 60 minutos e, após a incubação foi adicionado 200 µL da solução de precipitação de proteínas ao lisado de células tratadas com RNase, que foi agitado vigorosamente em alta velocidade por 20 segundos para misturar a solução de precipitação de proteínas com o lisado de células. A amostra foi incubada em gelo por 5 minutos e então centrifugada a 13.000-16.000×g durante 3 minutos.

O sobrenadante contendo o DNA foi transferido para um microtubo de 1,5 mL contendo 600 µL de isopropanol e misturado suavemente por inversão. A amostra foi centrifugada a 13.000-16.000×g durante 2 minutos, o sobrenadante foi descartado cuidadosamente e o tubo escurrido em papel absorvente. Foram adicionados 600 µL de etanol 70% à temperatura ambiente, e o tubo invertido cuidadosamente várias vezes, para lavar o sedimento de DNA. A amostra foi centrifugada a 13.000-16.000xg durante 2 minutos e o etanol aspirado cuidadosamente.

Novamente, o tubo foi escoado em papel absorvente e o *pellet* deixado para secar por 10-15 minutos. Por fim, foram adicionados 100 µL de solução de reidratação de DNA ao tubo e incubado a 65°C por 1 hora. O DNA foi armazenado a 2- 8°C.

A quantificação do DNA foi realizada em Nanodrop (ThermoScientific®) em comprimento de onda de 260nm, observando sempre a relação 260/280 a fim de verificar a integridade do DNA (relação entre 1,8 - 2,0). O DNA extraído foi diluído em água ultrapura estéril para atingir a concentração de 10 ng/µL.

Para a tipagem RAPD foi utilizado o protocolo descrito por Akopyanz et al. (1992) com modificações. O volume final para a reação de amplificação foi de 20µL, composto por 10ng do DNA bacteriano e pelos reagentes: (Tampão 1mM: 10mM de Tris HCl; 50mM de KCl); 4,0mM de MgCl₂ e 3,5U de Ultratools DNA polimerase; 200µM de cada desoxi nucleotídeo trifosfatado (DNTP) e 30 picomoles do primer (Invitrogen®). Cada primer (tabela 2) foi analisado separadamente.

Tabela 2: Primers utilizados no RAPD-PCR dos isolados de *Campylobacter jejuni*

Primers	Sequência 5'→ 3'	Referência
HLWL 85	ACGTATCTGC	Mazurier et al., 1992
1290	GTGGATGCGA	Akopyanz et al., 1992

Os controles positivos de *C. jejuni* (ATCC 33291) e de *C. coli* (ATCC 43478) foram usados em todas as reações de amplificação, bem como um controle negativo, composto por água ultrapura estéril, adicionada à mistura da reação, em substituição ao DNA alvo.

A amplificação obedeceu aos ciclos: 1 ciclo inicial a 92° C por 2 minutos; 35 ciclos das 3 etapas: desnaturação a 92° C por 15 segundos, anelamento a 36° C por 1 minuto, extensão a 72° C por 1 minuto; e 1 ciclo de extensão final a 72°C por 5 minutos.

A separação dos produtos amplificados (8µL) foi realizada em eletroforese em gel de agarose a 1,5% (Affymetrix®), utilizando o tampão de corrida TBE 0,5x (Invitrogen®) e como padrão de peso molecular o marcador de 100pb (Invitrogen®).

Para verificar a similaridade entre as cepas, os géis com os produtos amplificados foram levados ao aparelho de captação de imagens (Loccus Biotecnologia) e a análise computacional foi realizada no Programa GelCompar II. As bandas de fraca, média e forte intensidade captadas pelo programa foram consideradas na análise e a matriz de similaridade obtida por comparação entre pares de cepas usando o coeficiente de similaridade de Dice, adotando-se 1% de tolerância, para cada primer separadamente. A análise final foi baseada na média de

experimentos (average from experiments). Foi utilizado o método UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean) para a construção do dendrograma, englobando todas as cepas estudadas (MADDEN et al., 2007).

2.3. Comparação das técnicas

Foram comparados os dendrogramas obtidos por ambas as técnicas para determinar o poder discriminatório de cada uma, avaliando o agrupamento das cepas e a capacidade de determinar diferenças entre elas, assim como, discutidos os resultados do RAPD com ou uso de cada um dos *primers* isoladamente ou em conjunto. A data de isolamento de cada uma das cepas foram introduzidas nos dendrogramas para auxiliar na análise epidemiológica dos resultados.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As classificações *cluster* foram atribuídas para os grupos formados com similaridade superior a 80% no RAPD e no PFGE. Para ambas as técnicas foi definido como perfil distinto, cepas com similaridade inferior a 80%, e grupo clonal, cepas com homologia igual a 100%.

Os dendrogramas (figuras 1, 2) e a tabela 1 mostram os resultados obtidos.

Tabela 3: Comparação dos resultados da análise dos dendrogramas obtidos pelas técnicas PFGE e RAPD de 42 cepas de *C. jejuni*.

Técnica	Perfis distintos	Clusters	Clones
PFGE	28	4	2
RAPD (1290-HLWL)	31	5	-

A análise das cepas pelo PFGE discriminou 28 perfis distintos (Figura 1), quatro *clusters* e dois grupos clonais, compostos cada um com duas cepas (F408, F384, F051, F045).

O dendrograma obtido pelo RAPD utilizando a média dos dois *primers* (1290-HLWL), permitiu a identificação de cinco *clusters* e 31 perfis distintos.

O RAPD-HLWL-1290 apresentou-se mais eficiente na discriminação das cepas, uma vez que o número de perfis distintos (31) foi superior e a quantidade de *clusters* e clones (cinco) foi inferior às demais técnicas. Apesar da designação do PFGE como técnica padrão para análises de similaridade, o RAPD demonstrou maior capacidade de diferenciação das cepas no presente estudo.

Diante dessas observações, cabe como sugestão a utilização de uma segunda enzima no PFGE aliada aos resultados obtidos com a *SmaI*, que provavelmente, poderia melhorar o poder discriminatório da técnica. Uma opção seria o uso da enzima *KpnI* (enzima de restrição de corte mais frequente) que reconhece as regiões 5'GGTACC3' e 3'CCATGG5'. Outra possibilidade seria o uso único da enzima *KpnI*, que de acordo com NIELSEN et al. (2000) e ONO et al., (2003) possui maior poder de distinção das cepas do que a enzima *SmaI* (5'CCCGGG3', 3'GGGCCC5') utilizada no presente estudo, além de permitir a obtenção de um maior número de bandas (NIELSEN et al., 2000; ONO et al., 2003).

Ao se comparar os *clusters* formados em cada uma das técnicas, observou-se que apenas o grupo composto pelas cepas F127 e F138 foi comum nos dois testes (Figuras 1, 2), sendo que a homologia foi de 86,7% no PFGE (grupo d), de 92,9% no RAPD-HLWL-1290 (grupo Q). Ambas as cepas foram isoladas de carcaças pertencentes a um mesmo lote, indicando uma possível contaminação cruzada durante o processamento na indústria.

A classificação de perfil distinto foi comum para oito cepas (F080, F084, F164, F172, F211, F255, F510, F644, F100 e F247) em ambas as técnicas, o que demonstra que realmente trata-se de cepas com origens totalmente diferentes.

As demais cepas apresentaram padrões de classificação diferentes em cada técnica, o que não permitiu realizar uma análise conjunta. Trata-se de técnicas que são baseadas em princípios distintos, o que provavelmente, acarretou as diferenças. O RAPD é uma técnica que comparada ao PFGE apresenta um baixo custo, rapidez e que não requer um equipamento complexo para

sua execução, porém tem baixa reprodutibilidade (ATIENZAR, JHA 2006; NEWELL et al, 2000). Esta técnica identifica polimorfismos no DNA bacteriano por *primers* curtos que podem ser aleatórios ou padronizados pelo uso, sendo provavelmente, apta para captar alterações pontuais, sem possuir como alvo regiões conservadas (KEERATIPIBUL, TECHARUWICHIT, 2012). Já o PFGE é considerado o padrão-ouro nas avaliações de tipagem molecular, uma vez que analisa o DNA total do micro-organismo, e as quebras realizadas ao longo do material genético pela enzima de restrição são feitas em regiões específicas, o que garante a elevada reprodutibilidade da técnica (GALLETI, 2010).

A homologia identificada no RAPD para as cepas F636/F639, F536/F514 e F408/F391 supramencionadas indica que cada um destes grupos possui uma origem comum. Permite também inferir, que provavelmente, houve negligência à biosseguridade durante processamento na indústria e contaminação cruzada, uma vez que as cepas foram provenientes de frangos pertencentes a um mesmo lote.

Independente da técnica, foi possível observar a grande variabilidade da espécie. Isso pode ser explicado pela característica de *C. jejuni* apresentar uma alta plasticidade do seu genoma devido à alta capacidade de recombinação gênica (WILSON et al., 2009). A espécie possui alta capacidade de adaptação por mutações, transferências gênicas verticais e horizontais, uma vez que *C. jejuni* são naturalmente competentes a adquirir DNA exógeno por transformação gênica (BIGGS et al., 2011; MERIC et al., 2014; SHEPPARD et al., 2015).

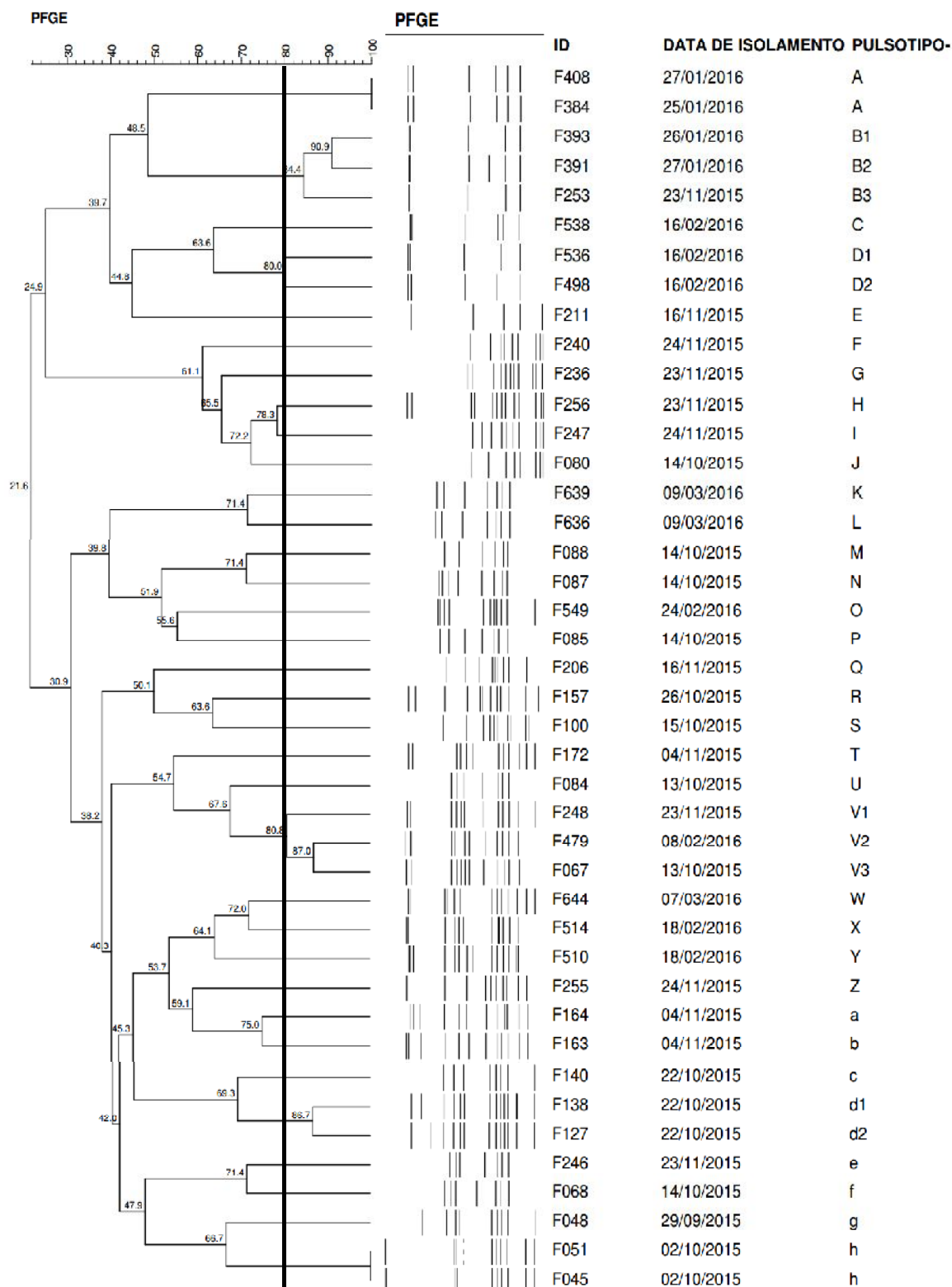


Figura 1. Dendrograma gerado por análise computadorizada (Gel Compar II) de perfis de DNA de 44 cepas de *C. jejuni* isoladas de carcaças de frango, com base em eletroforese em campo pulsado (PFGE) pelo método Dice / UPGMA, com tolerância de 1%, otimização de 0%, homologia $\geq 80\%$). Identificado com círculos os pulsotipos com $\geq 80\%$ de similaridade e tracejado os grupos clones.

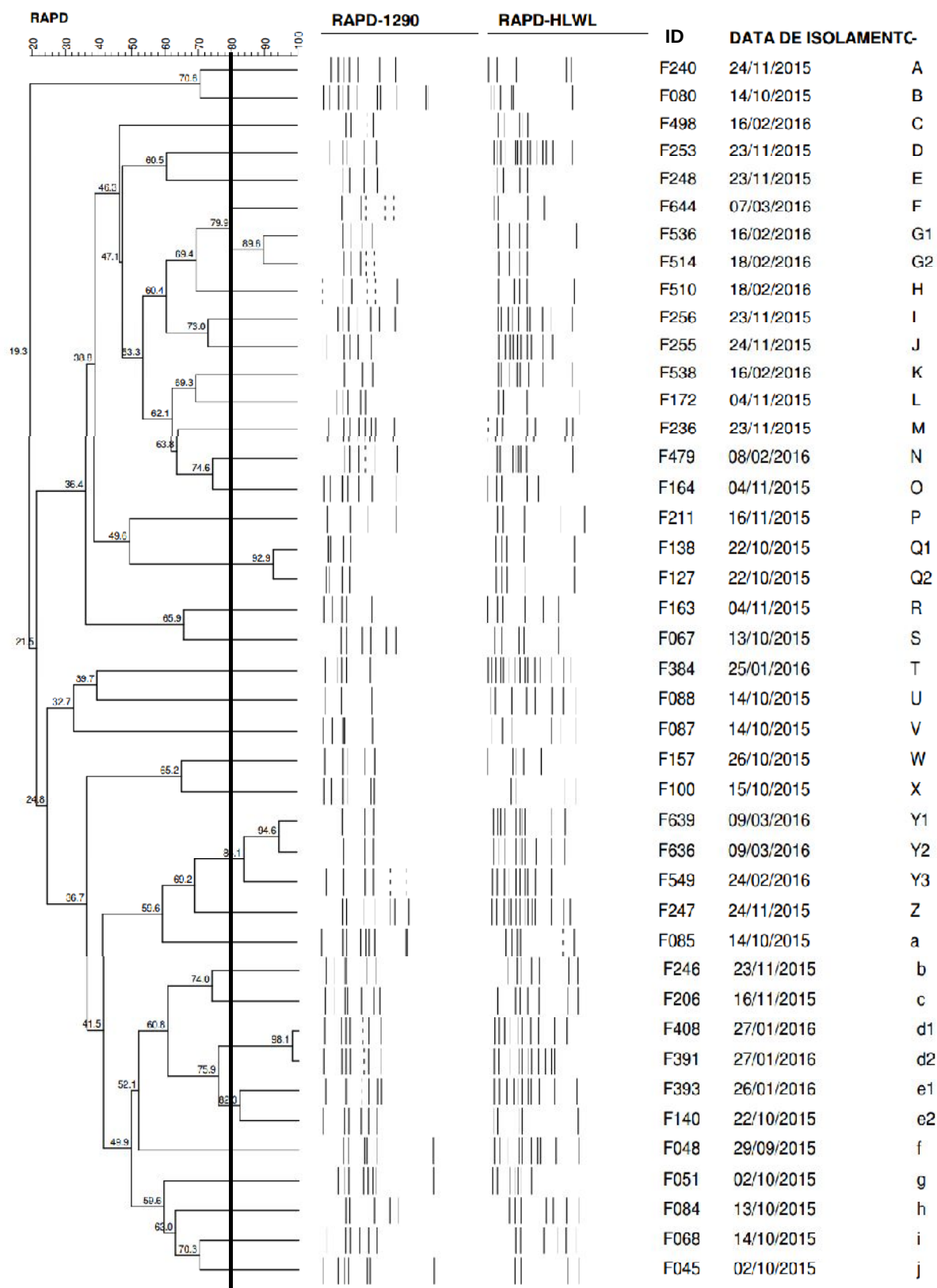


Figura 2. Dendrograma gerado por análise computadorizada (Gel Compar II) de perfis de DNA de 44 cepas de *C. jejuni* isoladas de carcaças de frango, pelo RAPD utilizando os *primers* (1290) e (HLWL) com método Dice / UPGMA, com tolerância de 1%, otimização de 0,5%, homologia $\geq 80\%$). Identificado com círculos os clusters com $\geq 80\%$ de similaridade.

4. CONCLUSÃO

As técnicas testadas mostraram resultados de difícil comparação e discrepantes para a maioria das cepas. O RAPD demonstrou um poder discriminatório maior que o PFGE, que é o “padrão-ouro” na genotipagem bacteriana, porém, outros fatores como a reprodutibilidade devem ser levados em consideração na escolha de um método de tipagem.

PERSPECTIVAS FUTURAS

Uma sugestão para a maximização do poder discriminatório do PFGE, é a utilização de uma segunda enzima como a *kpnI*. Deve ser testada a reprodutibilidade da técnica RAPD.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKOPYANZ, N.; BUKANOV, N. O.; WESTBLOM, T. U.; KRESOVICH, S.; BERG, D. E. DNA diversity among clinical isolates of *Helicobacter pylori* detected by PCR-based RAPD fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, v. 20, n. 19, p. 5137 - 5142, 1992.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL – ABPA. Relatório Anual de atividades 2017, **ABPA**. Disponível em: <http://abpa-br.com.br/>, Acesso em: 15 de nov. 2017.

ATIENZAR, F.A.; JHA, A.N. O ensaio de DNA polimórfico amplificado aleatorizado (RAPD) e técnicas relacionadas aplicadas a estudos de genotoxicidade e carcinogênese: uma revisão crítica. **Mutation Research** v. 613, p. 76 – 102, 2006.

BIGGS, P. J. et al. Whole-genome comparison of two *Campylobacter jejuni* isolates of the same sequence type reveals multiple loci of different ancestral lineage. **PLoS One**, v. 6, n. 11, e27121, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Doenças Transmitidas por Alimentos**. Portaria SVS/MS nº 1.271 de 6 de junho de 2014. Disponível em: <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2015/novembro/09/Apresenta----o-dados-gerais-DTA-2015.pdf> , Acesso em 20 de nov. de 2017.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases**, 2015, Disponível em:

<http://www.cdc.gov/nczved/divisions/dfbmd/diseases/campylobacter>. Acesso em: 15 de nov. de 2017.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Standard Operating Procedure for PulseNet PFGE of *Campylobacter jejuni* **CDC**, 2013. Disponível em: <http://www.cdc.gov/pulsenet/pdf/campylobacter-pfge-protocol-508c.pdf> Acesso em: 12 de nov. de 2017.

CHUMA, I. S. et al. Epidemiology and RAPD-PCR typing of thermophilic *campylobacters* from children under five years and chickens in Morogoro Municipality, Tanzania. **Biomed Central Infectious Diseases**, v. 16, n. 692, p. 2-11, 2016.

DAIVID, J. M. et al. Do contamination of and exposure to chicken meat and water drive the temporal dynamics of *Campylobacter* cases? **Epidemiology & Infection**, v. 145, n. 15, p. 3191 - 3203, 2017.

EFSA - European Food Safety Authority – The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013, **The European Food Safety Authority Journal**. Italy, v. 13, n. 1, p. 3991, 2015.

GALLETI, R. **Estudo de Pseudomonas aeruginosas produtoras de metalo-beta-lactamases e de genes envolvidos na resistência aos carbapenêmicos**. 2010. 49 f. Tese (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

GUNTHER, N. W.; CHEN, C. Y., The biofilm forming potential of bacterial species in the genus *Campylobacter*. **Food Microbiology**, v. 26, n.1, p.44-51, 2009.

JONH, A. et al. Profound differences in the transcriptome of *Campylobacter jejuni* grown in two different, widely used, microaerobic atmospheres. **Research in Microbiology**, v. 162, n. 4, p. 410 - 418, 2011.

KEERATIPIBUL, S.; TECHARUWICHIT, P. Tracking sources of *Listeria* contamination in a cooked chicken meat factory by PCRRAPD-based DNA fingerprinting. **Food Control**, v. 27, p. 64–72, 2012.

LPSN – **List of Prokaryotic Names with standing in nomenclature**, 2015. Disponível em: <<http://www.bacterio.net/campylobacter.html>> Acesso em: 15 nov. 2017.

MADDEN, R. H.; MORAN, L.; SCATES, P. Diversity of *Campylobacter coli* genotypes in the lower porcine gastrointestinal tract at time of slaughter. **Letters in Applied Microbiology**, v. 45, n. 6, p. 575 – 580, 2007.

MANFREDA, G. et al. Typing of *Campylobacter jejuni* Isolated from Turkey by Genotypic Methods, Antimicrobial Susceptibility, and Virulence Gene Patterns: A Retrospective Study. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 13, n. 9, p. 490 - 494, 2016.

MAZURIER, S. I. et al. A comparative study of randomly amplified polymorphic DNA analysis and conventional phage typing for epidemiological studies of *Listeria monocytogenes* isolates. **Microbiological Research**, v. 143, p. 507-512, 1992.

MERIC, G. et al. A reference pan-genome approach to comparative bacterial genomics: identification of novel epidemiological markers in pathogenic *Campylobacter*. **PLoS One**, v. 9, n. 3, p. e92798, 2014.

NEWELL, D. G. et al. **New developments in the subtyping of *Campylobacter* species**
In: Nachamkin I, Blaser MJ (eds) *Campylobacter*, 2nd edn. Washington, DC: American Society for Microbiology, p. 27–44, 2000.

NONGA, H. E.; MUHAIRWA, A. P.; Prevalence and Antibiotic Susceptibility of Thermophilic *Campylobacter* Isolates from Free-Range Ducks in Morogoro Municipality, Tanzania. **Tropical Animal Health and Production**, v. 42, n. 2, p. 165 – 72, 2009.

SEJVAR, J. J. et al. Population incidence of Guillain–Barré syndrome: a systematic review and meta-analysis. **Neuroepidemiology**, v. 36, p. 123 – 33, 2011.

SHEPPARD, S. K.; MAIDEN, M. C.; The evolution of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. **Cold Spring Harbor Perspectives Biology**, v. 7, p. 1 – 13, 2015.

SILVA, D. T. et al. *Campylobacter* species isolated from poultry and humans, and their analysis using PFGE in southern Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, v. 217, p. 189 - 194, 2016.

SILVA, J. et al. *Campylobacter* spp. As a foodborne pathogen: a review. **Frontiers in Microbiology**, v. 2, n. 200, p.1 - 12, 2011.

TAYLOR, E. V. et al. 'Common source outbreaks of *Campylobacter* infection in the USA, 1997–2008'. **Epidemiology and Infection**, v. 141, n. 5, p. 987 – 996, 2013.

WASSENAAR, T. M.; NEWELL, D. G. (2000). Genotyping of *Campylobacter* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 1, p. 1 – 9, 2000.

WILLIAMS, J. G. et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**. v. 18, n. 22, p. 6531 – 6535, 1990.

WILSON, D. J. et al. Rapid evolution and the importance of recombination to the gastroenteric pathogen *Campylobacter jejuni*. **Molecular Biology and Evolution**, v. 26, n. 2, p. 385 - 397, 2009.

WHO - World Health Organization. **Water-related diseases**. 2011. Disponível em: <http://www.who.int/water_sanitation_health/diseases/campylobacteriosis/en/> Acesso em: 23 ago. 2011.

