

UTILIZAÇÃO DE TÉCNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR PARA DIAGNÓSTICO DE *Campylobacter coli*

Edilaine Belchior¹, Alessandro Afornali².

1 Acadêmico do curso de Tecnologia em Bioprocessos e Biotecnologia da Universidade Tuiuti do Paraná (Curitiba, PR);

2 Laboratório de Genômica do Instituto Carlos Chagas (ICC) – PR – Brasil, Prof. Adjunto Mestre da Universidade Tuiuti do Paraná (Curitiba, PR); Pesquisador IV do O BOTICÁRIO

Endereço para correspondência: Alessandro Afornali, aafornali@gmail.com

RESUMO: A saúde sempre foi um fato primordial para a sobrevivência da humanidade, mais nas últimas décadas principalmente em países desenvolvidos tem se tornado um agravante, devido á contaminações por microorganismos. A detecção e tratamento correto para essas enfermidades sempre foi uma barreira devido à diversidade desses agentes microbianos. Há uma grande incidência de gastroenterite em seres humanos ocasionado por bactérias do gênero *Campylobacter Coli*, que ainda não possui um tratamento adequado, pois seu mecanismo de patogenicidade ainda não está bem elucidado. Com a utilização de técnicas de biologia molecular para a padronização de um protocolo de amplificação, a partir de *primers* iniciadores já estabelecidos pela bioinformática, os testes realizados auxiliaram para um diagnóstico clínico mais preciso, obtendo-se a amplificação.

Palavras-chave: gastroenterite, *Campylobacter coli*, Biologia molecular.

ABSTRACT: Health has always been a fact vital to the survival of humanity, most especially in recent decades in developed countries has become an aggravating factor, due to contamination by microorganisms. The detection and correct treatment for these diseases has always been a barrier because of the diversity of microbial agents. There is a high incidence of gastroenteritis in humans caused by bacteria called *Campylobacter coli*, which does not have an adequate treatment, because its mechanism of pathogenicity is not well understood. By using molecular biology techniques for the standardization of a protocol of amplification from primers *primers* already established by bioinformatics, the tests helped to a more accurate clinical diagnosis, resulting in the amplification.

Keywords: gastroenteritis, *Campylobacter coli*, Molecular biology.

INTRODUÇÃO

As enfermidades diarréicas em seres humanos constituem um problema de saúde pública mundial. Especialmente em países em desenvolvimento, espécies de *Campylobacter spp.* tem sido responsabilizada como um dos agentes etiológicos que mais tiveram destaque em doenças veiculadas por alimentos (FITZGERALD *et al.*, 2001).

O gênero *Campylobacter* engloba 21 espécies, 9 subespécies e 32 cepas, sendo que a *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* e *Campylobacter lari* pertencem ao grupo de bactérias denominadas termofílicas, sua temperatura ótima de incubação oscila entre 42 °C e 43 °C, e as espécies *C. jejuni* e *C. coli* constituem-se nas espécies mais freqüentes de enterites humanas (SCARCELLI *et al.*, 1998).

Nestes últimos anos reforçou-se para a medicina a grande importância do reconhecimento de certas espécies patogênicas do gênero *Campylobacter*. Algumas espécies são consideradas como zoonoses importantes tais como *C. coli* e *C. jejuni* os quais resultaram em estudos dirigidos para a taxonomia, epidemiologia, biologia molecular e patogenia. Estudos recentes em modelos animais têm ajudado a elucidar, os mecanismos patogênicos desses agentes, especialmente quanto ao fator de virulência (CAVIÚNAS, 2003).

O gênero *Campylobacter* tem grande importância na saúde pública, pois várias espécies deste gênero podem causar diarréia e seu isolamento tem apresentado maior freqüência em seres humanos, alimento e água (ALTEKRUSE, 1999). A transmissão de *Campylobacter spp.* está geralmente associada ao consumo de alimentos contaminados (SKIRROW, 1995). Surtos de campilobacteriose estão relacionados em grande número a carne de aves e seus subprodutos (EVANS, 1992).

A *Campylobacter coli* representa cerca de 5% das causas de gastroenterite intestinal em humanos (EVANS, 1992). Os principais sintomas da doença iniciam-se com febre, cefaléia, dores musculares, mal-estar e dor abdominal com cólicas em volta do umbigo, que podem ser confundida com apendicite. As cólicas podem permanecer mesmo após ter cedido à diarréia (CAVIÚNAS, 2003). Os sintomas podem permanecer por semanas determinando quadros sintomáticos, recuperações espontâneas e recaídas até a cessação (COX, 2002).

Apesar de vários estudos já realizados a espécie *Campylobacter coli* está pouco elucidada, pois sua patogenicidade ainda não está bem definida (ZABOTT, 2009), porém a espécie *Campylobacter coli* está intimamente relacionada com a espécie *Campylobacter jejuni* pelo fato de seus mecanismos patogênicos causarem gastroenterite intestinal (GENIGEORGIS, 1987; VARNAM & EVANS, 1991). A detecção e diferenciação entre as duas espécies são necessárias, sendo um diferencial para tratamentos mais rápidos e eficazes, o que é de grande importância clínica, além de se saber o gene responsável pela patogenicidade.

Pela dificuldade de isolamento e identificação de microorganismos exigentes como *Campylobacter spp.* por métodos de cultura tradicional, técnicas de biologia molécula vêm sendo aplicadas para identificação. Para aumentar a rapidez dos resultados e diminuir erros operacionais aparelhos automatizados utilizando tecnologia de PCR são utilizados com grande sucesso (ZAKI, 2001).

O uso de técnicas moleculares, como a técnica da reação em cadeia de polimerase (PCR), tem sido usado frequentemente em testes de diagnósticos devido suas vantagens na pesquisa de um grande número de amostras em um curto intervalo de tempo, além, de todo organismo vivo possuir sequências de nucleotídeos no DNA que são únicas e específicas para cada espécie, facilitando sua distinção. Através da técnica é possível obter-se cópias de uma parte do material genético em quantidade suficiente que permita detectar e analisar a sequência que é o alvo do estudo. Para que ocorra essa quantidade específica, a amplificação pela PCR depende de *primers* para dar partida ao processo da sequência alvo que se quer amplificar.

Após projeto iniciado pela análise genômica e comparativa entre espécies *C. coli* e *C. jejuni* utilizando banco de dados biológicos e ferramentas de bioinformática, foi obtido dez *primers* específicos possíveis para os testes de amplificação do gene (ZABOTT, 2009).

Através desse estudo que será realizado *in vitro* com a utilização desses mesmos *primers*, utilizaremos técnicas de genética molecular como reação em cadeias de polimerase (PCR) para obter um diagnóstico rápido e preciso de gastroenterite intestinal causada por essa espécie.

O presente estudo teve como objetivos realizar a padronização de um protocolo de amplificação, através de diferentes testes, verificando principalmente se os

iniciadores anterógrados e retrógrados gerados no *primer-BLAST* seriam adequados para o método de PCR.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostragem – cepas *C. coli*

As amostras da cepa de *C. coli* foram gentilmente cedidas pelo Dr. Marcos J. P. Gomes da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. As amostras, antes do envio, foram inativadas por calor. As bactérias não suportam a fervura e assim garantem total segurança e prevenção de riscos de contaminação durante o transporte e manipulação. As amostras foram endereçadas ao Instituto Carlos Chagas (ICC) a qual foram recebidas em condições apropriadas para armazenagem e remetidas ao Laboratório de Biologia Molecular do Boticário para o processo de extração do DNA.

Purificação do DNA da amostra de *C. coli*

A etapa foi realizada com o auxílio do kit DNA *Purification System Wizard SV Genomic* (Promega) específico para isolamento de ácidos desoxirribonucléicos. O método abrange 13 etapas desde lise, centrifugação, lavagem, eluição até congelamento da amostra à -20°C.

A análise de quantificação foi realizada através do Nanodrop 2000C, sendo valor obtido de 53,3 ng/μL final.

Amplificação de *C. coli* por PCR

Utilizou-se na pesquisa os oligonucleotídeos iniciadores (número de acesso no GenBank: AY330110.1) *forward* (5'- GGG TTT GCA TGG TGT GGG CG – 3') e *reverse* (3'- TGC GTT CCA CCA TCA GGG GT – 5'), os quais foram obtidos por ZABOTT e colaboradores em 2009, através da análise genômica da espécie sequenciada utilizando banco de dados biológicos e ferramentas de bioinformática (tabela 1), tendo como alvo a subunidade B da DNA girase (*GyrB*), o laboratório Invitrogen em São Paulo foi o responsável pela síntese da sequência dos óligos.

O iniciador anterógrado e retrógrado possui 20 pares de base e 20 pares de base, sendo sintetizados e liofilizados a uma concentração final de 34,2 nmol e 43,09 nmol, respectivamente. Os iniciadores foram submetidos a uma diluição estoque de 100 pmol e depois de diluídos a uma concentração de 10 pmol para solução de uso.

TABELA 1 – Lista dos óligos iniciadores.

Nº do primer	Sequência dos primer 5'→3'	Temperatura de anelamento em °C	CG%	Tamanho do produto (pb)
1 – coli	F - GGGTTTGCATGGTGTGGGCG	59,08	65,00	495
1 – coli	R - TCGTTCCACCATCAGGGGT	57,96	60,00	
2 – coli	F - GGGTTTGCATGGTGTGGGC	58,71	65,00	496
2 – coli	R - TCGTTCCACCATCAGGGGT	57,96	60,00	
3 – coli	F - GGGTTTGCATGGTGTGGGCGT	60,45	61,90	495
3 – coli	R - TCGTTCCACCATCAGGGGT	57,96	60,00	
4 – coli	F - GGGTTTGCATGGTGTGGGCG	59,08	65,00	495
4 – coli	R - TCGTTCCACCATCAGGGGTT	58,34	57,14	
5 – coli	F - GGTTTGCATGGTGTGGGCGT	58,37	60,00	494
5 – coli	R - TCGTTCCACCATCAGGGGT	57,96	60,00	
6 – coli	F - GGGTTTGCATGGTGTGGGCG	59,08	65,00	497
6 – coli	R - CATGCGTTCCACCATCAGGGGT	59,15	59,09	
7 – coli	F - GGGTTTGCATGGTGTGGGCG	59,08	65,00	496
7 – coli	R - ATGCGTTCCACCATCAGGGGT	58,13	57,14	
8 – coli	F - AGGGGGTTTGCATGGTGTGGG	59,22	61,90	498
8 – coli	R - TCGTTCCACCATCAGGGGT	57,96	60,00	
9 – coli	F - GGGGGTTTGCATGGTGTGGGC	60,78	66,67	497
9 – coli	R - TCGTTCCACCATCAGGGGT	57,96	60,00	
10 coli	F - GGGTTTGCATGGTGTGGGC	58,71	65,00	496
10 coli	R - TCGTTCCACCATCAGGGGTT	58,34	57,14	

GC% = porcentagem de guanina e citosina na sequência do iniciador; F = iniciador anterógrado (*forward*); R= iniciador retrógrado (*reverse*).

Os testes de amplificação seguiram um parâmetro já estabelecido de PCR com misturas preparadas com água ultrapura (Milli Q®), dNTPs, 10 µl tampão *Buffer Taq*, 1,5 µl MgCl₂, cada um dos dois iniciadores e enzima *Taq* polimerase. Estas misturas, adicionadas de DNA purificado ou da solução de bactéria inativada (sem purificação), foram colocadas em um tubo de volume 0,2 ml próprios para a termociclagem. As reações foram incubadas em um termociclador (*Biocycler MJ25*) seguindo os parâmetros sugeridos de tempos e temperaturas para desnaturação, anelamento e extensão. Foram realizados diversos testes conforme tabela 2 para a obtenção de um protocolo específico de amplificação.

TABELA 2 – Relação dos testes realizados na pesquisa.

TESTE	Concentração <i>C. coli</i> (DNA purificado – 53,3 ng) - ng	Concentração <i>C. coli</i> (bactéria fervida) - ng	Enzima utilizada - U	Concentração de <i>primer</i> - pmol	Volume final da reação - µl	Temperatura de anelamento - ° C	Tempo de extensão (s)
1	100	X	5U <i>Taq polimerase</i>	10	100	55	40
2	200	X	5U <i>Taq polimerase</i>	10	100	52	40
3	100	X	5U <i>Taq polimerase</i>	10	100	52	50
4	100	X	5U <i>Taq polimerase</i>	10	100	55	50
5	100	X	5U <i>Taq polimerase</i>	1	70	55	50
6	100	X	5U <i>Taq polimerase</i>	1	100	55	50
7	X	400	5U <i>Taq polimerase</i>	1	40	55	60
8	X	400	2U <i>Taq polimerase</i>	1	40	55	60
9	X	200	2U <i>Taq polimerase</i>	0,5	40	55	60
10	X	200	5U <i>Taq polimerase</i>	1	40	55	60
11	X	100	5U <i>Taq polimerase</i>	1	90	51,3 - 60	60
12	X	400	5U <i>Taq polimerase</i>	1	50	51,3 - 60	60
13	X	100	5U <i>Taq polimerase</i>	1	50	51,3 - 60	60
14	100	X	5U <i>Taq polimerase</i>	<i>C. coli</i> - 10	50	52	60
15	100	X	5U <i>Taq polimerase</i>	<i>C. jejuni</i> - 10	50	52	60
16	100	X	5U <i>Taq polimerase</i>	<i>C. coli</i> - 10	50	54	60
17	100	X	5U <i>Taq polimerase</i>	<i>C. jejuni</i> - 10	50	54	60
18	100	X	5U <i>Taq polimerase</i>	<i>C. coli</i> - 10	50	56	60
19	100	X	5U <i>Taq polimerase</i>	<i>C. jejuni</i> - 10	50	56	60
20	100	X	5U <i>Taq polimerase</i>	<i>C. coli</i> - 10	50	58	60
21	100	X	5U <i>Taq polimerase</i>	<i>C. jejuni</i> - 10	50	58	60
22	100	X	5U <i>Taq polimerase</i>	<i>C. coli</i> - 10	50	60	60
23	100	X	5U <i>Taq polimerase</i>	<i>C. jejuni</i> - 10	50	60	60
24	X	400	2U <i>Taq polimerase</i>	10	30	51,3 – 60	60
25	X	400	2U <i>Taq polimerase</i>	1	40	51,3 – 60	60
26	X	400	5U <i>Taq polimerase</i>	10	60	51,3 – 60	60
27	X	400	5U <i>Taq polimerase</i>	1	70	51,3 – 60	60
28	X	400	2U <i>Taq polimerase</i>	10	50	51,3 – 60	60
29	X	300	5U <i>Taq polimerase</i>	10	100	52	40
30	X	100	5U <i>Taq polimerase</i>	10	100	52	50
31	X	100	5U <i>Taq polimerase</i>	10	100	55	50
32	X	100	5U <i>Taq polimerase</i>	1	70	55	50
33	X	100	5U <i>Taq polimerase</i>	1	100	55	50

A tabela mostra a variação que ocorreram durante os testes

Todos os produtos amplificados foram analisados em gel de agarose a 1% a uma voltagem constante de 150 v, utilizando-se sempre um marcador padrão de peso molecular de 1 kb *Plus DNA Ladder*. Um volume de 10µl das amostras foi aplicado em 2µl com tampão de glicerol contendo azul de bromofenol e xilenocianol.

Após corrida das amostras de 30 minutos o gel foi submetido a uma solução de brometo de etídio por 5 minutos para marcação do DNA e após lavagem a visualização foi realizada sob radiação ultravioleta (UV) em transiluminador.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na purificação do DNA da bactéria *Campylobacter coli* com a utilização do kit *DNA Purification System Wizard SV Genomic* (Promega) e a confirmação através de um gráfico gerado pelo NANODROP 2000c, foi obtido 53,3ng de DNA purificado, suficiente para o processo de amplificação para PCR.

A geração do par de *primes* seguiu os parâmetros estabelecidos de tamanho do produto amplificado entre 100 pb e 1000 pb, retornam de 10 pares de iniciadores, temperatura de anelamento variando entre 57 a 63°C. Foi verificado contra o banco de dados do genoma humano, garantindo maior especificidade às seqüências de iniciadores resultantes (ZABOTT, 2009).

A Tabela 1 apresenta a lista dos iniciadores anterógrados e retrógrados selecionados pelo programa numerados de 1 a 10, juntamente à porcentagem de guaninas e citosinas presente na seqüência dos iniciadores e temperatura ideal de anelamento, sendo que os tamanhos dos produtos oriundos das limitações prevista pelo iniciador variam de 495 pb a 496 pb. Cuidadosamente a escolha dos *primers* pode significar economia de tempo e de gastos. Assim uma das principais considerações em um protocolo de desenho de *primer* é obter um único e específico produto prescrito pelos *primes* selecionados. O primeiro passo para a escolha dos *primers* é garantir sua especificidade.

A padronização das condições de amplificação foi realizada através de testes conforme tabela 2 onde foram alteradas as concentrações da amostra purificada ou fervida; a água para se obter uma diluição necessária; a quantidade e o tipo de enzima, na tentativa de um melhor anelamento dos *primers*; a concentração dos *primers*, evitando que o seu excesso inibisse as reações; para a temperatura de anelamento à 52°C e 55°C, seguindo alguns parâmetros de protocolo, pois se a

temperatura de anelamento for muito baixo, *primers* podem anelar em alvos similares e amplificar produtos não específicos. Se T_a for alto demais, a probabilidade do anelamento diminui e a quantidade de produto também; no tempo extensão para a formação de um produto com tamanho adequado para a análise pretendida. O restante do protocolo se manteve constante em todos os testes.

Todos os produtos amplificados por PCR foram analisados após a eletroforese em gel de agarose e visualizadas em radiação UV com o auxílio do transiluminador. No teste 5 foi possível visualizar a amplificação do DNA pelo *primer* em 495bp comparando-se ao marcador de DNA *Ladder* 1 kb, mais o produto gerado foi muito pouco sendo que a banda apresentava-se muito fraca, de difícil visualização. Nos outros testes o DNA amplificado gerou produtos de 200bp sendo que esse produto não era o alvo do nosso *primer*, esse fato pode ter ocorrido devido o DNA genômico da *Campylobacter coli* não estar totalmente completo e descrito no banco de dados do *GeneBank*, onde os *primers* foram desenhados.

CONCLUSÃO

A padronização de um protocolo de amplificação para o diagnóstico *Campylobacter coli* é importância para uma melhor avaliação médica, já que seu mecanismo de patogenicidade ainda não está bem definido, podendo assim ser diferenciada de outras bactérias do gênero *Campylobacter spp.* aonde já se conhece mecanismo de patogenicidade, tornando mais eficaz e contundente o tratamento.

A utilização de técnicas de bioinformática é fundamental para a melhor escolha dos *primers* a ser utilizado, esse instrumento é capaz de oferecer aumento da análise de sequências de DNAs de diferentes fontes. Contudo é necessário que o DNA genômico esteja totalmente codificado nos bancos de dados e programas computacionais disponíveis na *internet*, para que os *primers* desenhados sejam específicos, ou seja, não amplificar regiões onde os quais testados não apresentavam.

O segredo do sucesso da PCR reside na capacidade que ela tem de amplificar uma sequência precisa de DNA, ou seja, óligos específicos. Nesse trabalho foi utilizado um par de *primer*, dos dez iniciadores sugeridos pelo programa *Primer-BLAST* da bioinformática, sendo que outros estudos podem ser realizados para obter

um maior produto e resultados mais específicos, para a diferenciação de outras espécies obtendo um diagnóstico e tratamento contundente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTEKRUSE, S.F.; STERN, N.J.; FIELDS, P.I.; SWERDLOW, D.L. ***Campylobacter jejuni* an emerging foodborne pathogen**. *Emerging Infectious Diseases*, v.5, p.28-35, 1999.

BUTZLER, J. P. *Campylobacter*, from obscurity to celebrity. ***Clinical Microbiology and Infection***, Paris, v. 10, p. 868-876, 2004.

CAVIÚNAS - **BOLETIM DO CRIADOURO CAMPO DAS CAVIÚNAS**. São Paulo, n. 5, ago. 2003. Disponível em:
<http://www.aviarioangelcabrera.com/articulos/campylobacter.htm>. Acesso em: 16 jun. 2010.

CORTEZ, L.L.A. **Disseminação de bactérias dos gêneros *Campylobacter* e *Salmonella* em linhas de abate de aves**. Jaboticabal, São Paulo, 2006.

COX, L. A. **Re-examining the causes of campylobacteriosis**. *International Journal of Infectious Diseases*, v.6, n. 3, 2002.

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**. Laboratory of Veterinary Public Health, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo, Japan. 2002.

EVANS, S. Introduction and spread of thermophilic *Campylobacter* in broilers flocks ***Veterinary Research***, Paris, v.131, n.24,p 574-576,1992

FONSECA, B.B.; SONCINI, R. A.; FREZZA, A. L. C.; ROSSI, D. A. ***Campylobacter sp* em mecônio de pintainhos e em cloaca de reprodutoras de corte**. *Biosci. J.*, Uberlândia, v. 23, n. 3, p. 128-132, Jul/Set. 2007.

FONSECA, T.; CARDOSO, T.; PERDIGÃO S.; SARMENTO A.; MORGADO. R. **Síndrome de Guillan-Barré**. Departamento de Medicina Hospital Pedro Hispano. 2004.

FRANCO, B.D.G.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. ed Atheneu, Rio de Janeiro, RJ, 1996.

GENIGEORGIS, C. A importância da *Campylobacter* na avicultura. **Avicultura Industrial**, São Paulo, V.6, n.6, p.6-12, 1987.

GIACOBONI, G.; PUCHURI, M.C.; ECHEVERRIA, M.V. **Identificacion of *Campylobacters* isolated from dogs by using biotypes and protein electrophoretic patterns**, Argentina, 1999.

NCBI – National Center for Biotechnology Information. **Genbank**, 2009. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Acesso em: 01 out. 2010.

SCARCELLI, E.; GENOVEZ, M.E.; CARDOSO, M.V.; SOUZA, M.C.A.M.; GRASSO, L.M.P.S.; SOUZA, C.A.I.; TORRES, A.P. **Avaliação do potencial de disseminação de *Campylobacter* spp. por diferentes espécies animais**. Arquivos do Instituto

Biológico, São Paulo, v.65, n.1, p.55-61, 1998.

SKIRROW, M. B. *Campylobacter coli*. In: BLASER, M. J. et al. Infections of the gastrointestinal tract. New York: Raven press, 1995. p 123-138.

VARNAM, A. H.; EVANS M. G. **Foodborne pathogens: an illustrated text**. St. Louis: Moby-Year Book, 1991. p. 209-34.

ZABOTT, A., AFORNALI, A. **Uso da bioinformática na diferenciação molecular para *Campylobacter coli* e *Campylobacter jejuni***. TCC apresentado em 2009 para o curso de Tecnologia em Bioprocessos e Biotecnologia.

ZAKI, M.; CLARK, C.G. Isolation and characterization of polymorphic DNA from *Entamoeba histolytica*. J.Clin. Microbiol., Washington, D.C, v.39, n.3 p.987-905, 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO. *Campylobacter*. 2000. Disponível em:
<<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs255/en/print.html>>. Acesso em: 22 out. 2010