



AVALIAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS DE SOROTIPOS DE SALMONELAS EM ALIMENTOS NO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL DE 2010 A 2015

Lucas Michel Wolf^{1,2}
Rafael Reis²
Jonas Michel Wolf²
Vagner Ricardo Lunge³
Nilo Ikuta^{3,4}

Resumo

Salmonella é uma das principais bactérias responsável por doenças a partir da ingestão de produtos de origem animal. Registros de surtos de salmoneloses alimentares em seres humanos ocorreram principalmente por determinados sorotipos patogênicos, como Enteritidis e Typhimurium. O presente estudo objetivou principalmente analisar as frequências de salmonelas em diferentes alimentos no estado do Rio Grande do Sul (RS). Foram utilizadas 121 amostras de alimentos coletadas no Laboratório Central de Saúde Pública do Rio Grande do Sul (LACEN), no período de 2010 a 2015 provenientes de 36 cidades do estado do RS. Os isolamentos das salmonelas foram realizados com o emprego de técnicas microbiológicas específicas, utilizando meios de culturas próprios e provas bioquímicas. As sorotipagens foram conduzidas de acordo com *Kauffmann-White-Le Minor* (KWL). Para o diagnóstico molecular, a extração do DNA foi realizada pelo método de fervura e os procedimentos de PCR (*Polymerase Chain reaction*) foram efetuados posteriormente com condições específicas. Os alimentos que apresentaram salmonelas em maiores frequências foram saladas de maionese (21,5%), carne bovina e derivados (13,2%), *fast-foods* (12,4%) e carne suína e derivados (11,6%). As cidades com maiores números de alimentos contaminados foram Porto Alegre com 13,2%, Cachoeira do Sul (9,9%) e Novo Hamburgo (8,3%). Os sorotipos predominantes foram Enteritidis (48,8%) e Typhimurium (16,5%). Estes casos foram confirmados pelo PCR Multiplex. Este estudo permitiu o entendimento dos percentuais alimentares contaminados, eventos por cidades, das distribuições dos sorotipos de salmonelas no estado do RS e do desempenho do método de PCR multiplex.

Palavras-chave: Salmoneloses; Diagnóstico molecular; Enteritidis; Typhimurium.

INTRODUÇÃO

Salmonella é um dos principais agentes bacterianos com potencial de ocasionar doenças a partir da ingestão de produtos de origem animal, como por exemplo, ovos, carnes, produtos processados, entre outros (SCHROEDER et al., 2006). Os sintomas característicos da doença são náuseas, vômitos, diarreia intensa, febre baixa, prostração, melenas, cólicas intestinais e dores de cabeça. Os alimentos são contaminados pela presença da bactéria no ambiente de criação e durante o processamento de abate, caso não sejam tomados cuidados higiênico-sanitários adequados (MAJOWICZ et al., 2010). Nas décadas de 1980 e 1990 surtos de salmoneloses alimentar em seres humanos ocorreram principalmente por determinados

¹ Aluno do curso de Medicina Veterinária - Bolsista PIBITI/CNPq- lucaswolf503@gmail.com

² Laboratório de Diagnóstico Molecular – ULBRA –

³ Professor do PPGBioSaúde – vagner.lunge@gmail.com

⁴ Orientador - ikuta.ulbra@gmail.com

sorotipos patogênicos, como Enteritidis e Typhimurium (GAST et al., 2008; BERCHIERI; OLIVEIRA, 2010).

A classificação da doença, baseada em investigações moleculares, estratifica o gênero em duas espécies, que são representadas por *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori*. *Salmonella enterica* é subdividida em seis subespécies designadas como *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *hutnae* e *indica* (CDC, 2011). Os isolados de *Salmonella* são também classificados em sorotipos, sendo que já foram demonstrados mais de 2.500 variantes antigênicas distribuídas globalmente com a quase totalidade (99,5%) pertencente à subespécie *enterica* (GRIMONT; WEILL, 2007; GUIBOURDENCHE et al., 2010). As denominações dos sorotipos e as respectivas fórmulas antigênicas estão listadas em um documento chamado *Kauffmann-White-Le Minor* (KWL) (Issenhuth-Jeanjean et al., 2014).

Métodos de diagnóstico molecular para a detecção e caracterização de *Salmonella* têm sido formulados e empregados em laboratórios, objetivando complementar a sorotipagem (IKUTA et al., 2009). Os métodos mais utilizados são variações da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR, *Polymerase Chain Reaction*) (GAST et al., 2008; ACHTMAN et al., 2012). Os primeiros ensaios de PCR tinham como alvos genes responsáveis pela codificação de estruturas antigênicas de salmonelas (HOORFAR et al., 1999). Mais recentemente, estudos de genomas completos permitiram a identificação de regiões sorotipos específicas e a implementação de métodos de PCR multiplex para detecção de dois sorotipos em único ensaio, como exemplo a detecção de Enteritidis e Typhimurium (MAURISCHAT et al., 2015).

O presente estudo teve como objetivo principal analisar os sorotipos de salmonelas isoladas de diferentes alimentos no estado do Rio Grande do Sul (RS) no período de 2010 a 2015.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostras

Foram analisados os dados de 121 isolados de *Salmonella* obtidos a partir de amostras de alimentos provenientes de 36 cidades do estado do Rio Grande do Sul e coletadas no período de 2010 a 2015. As salmonelas foram isoladas de diversos tipos de alimentos (salada de maionese, carnes e derivados de origem animal, *fasts-foods*, grãos, saladas de legumes e verduras, entre outros) de consumo rotineiro pelo homem. Estas amostras foram obtidas do Laboratório Central de Saúde Pública do Rio Grande do Sul (LACEN).

Isolamento bacteriano

O isolamento de *Salmonella* foi realizado com os meios sólidos seletivos ágar *Salmonella-Shigella* (SS), ágar xilose-lisina-desoxicolato (XLD) e ágar Verde Brilhante (VB). Todavia, anteriormente as bactérias foram enriquecidas em caldos, como o *Brain Heart Infusion* (BHI) ou *Rapaport-Vassiliadis* (RV). A incubação nos meios de cultura foi realizada em condições de aerobiose a 37 °C por 18-24h. As colônias típicas do gênero *Salmonella* nos meios seletivos (XLD ou VB) foram selecionadas para a identificação presuntiva usando o ágar *Triple Sugar Iron* (TSI). Colônias de 1 a 2 mm de diâmetro com centro enegrecido no ágar SS, após 24 horas de incubação (sugestivas do gênero *Salmonella*) foram submetidas à caracterização bioquímica, incluindo provas de utilização de carboidratos (glicose, lactose, sacarose, manitol e maltose), de produção de indol, de utilização do citrato, de redução de nitratos, de descarboxilação dos aminoácidos (lisina, arginina e ornitina), entre outras.

Sorotipagem

Os sorotipos foram classificados com base no procedimento de KWL. De forma inicial, os isolados suspeitos de *Salmonella* foram analisados por aglutinação em lâmina com antissoros específicos para antígenos O, o qual é baseado na análise de lipopolissacarídeos, que são classificados nos grupos A, B, C1, C2, D e E. Os antissoros H (flagelares) e Vi são reservados para o uso em identificações específicas. Atualmente este método emprega mais de 150 antissoros O e H para a caracterização dos sorotipos de *Salmonella*. A reação positiva para cada antissoro era observada pela aglutinação em lâmina.

Extração do DNA

A extração de DNA foi realizada pelo método de fervura conforme descrito por Soumet et al., (1994), com adaptações, onde uma pequena porção de colônia será retirada do meio sólido e adicionada a 100 µL de água tratada; em seguida, o material foi colocado no termobloco por 5 minutos a 100°C. Posteriormente, passou por choque térmico e foi centrifugado por 3 minutos a 10000 rpm. Finalmente, o sobrenadante foi utilizado no ensaio de PCR.

Detecção molecular

A confirmação do gênero *Salmonella* foi efetuada pela amplificação do gene *invA* por PCR em tempo real (*StepOne Plus – Applied Biosystems*, Carlsbad CA, EUA). A análise foi realizada diretamente no equipamento pela avaliação da presença de curvas de amplificação e determinação dos respectivos valores de Ct (*cycle threshold*). A confirmação dos sorotipos Enteritidis e Typhimurium foi realizada pela detecção dos genes *saFA* e *fliA-IS200* conforme descrito previamente (MAURISCHAT et al., 2015).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente, os dados foram analisados quanto ao ano de isolamento, os alimentos e a cidade de origem dos isolados e a frequência de sorotipos. Com relação ao número de casos de salmoneloses por ano, foram observados 33 (27,3%) no ano de 2010, 8 (6,6%) em 2011, 27 (22,3%) em 2012, 31 (25,6%) em 2013, 20 (16,5%) em 2014 e 2 (1,7%) em 2015.

Os principais alimentos contaminados foram salada de maionese n= 26 (21,5%), carne bovina e seus derivados n= 16 (13,2%), *fast-foods* (como xis burger, sanduíche, pastel e cachorro quente n= 15 (12,4%), carne suína e derivados n= 14 (11,6%) salada de legumes e verduras n= 10 (8,3%) e grãos (como arroz, feijão, milho e ervilha) n= 10 (8,3%). Os demais tipos de alimentos corresponderam a 30 amostras (24,8%).

Todos alimentos analisados foram provenientes do estado do RS, contemplando um total de 36 cidades. Uma análise descritiva informa que 16 (13,2%) advieram da cidade de Porto Alegre, 12 (9,9%) de Cachoeira do Sul, 10 (8,3%) de Novo Hamburgo e 9 (7,4%) de Encantado. As demais cidades formaram um montante de 74 (61,2%) casos.

As análises sorotípicas revelaram que 59 (48,8%) das amostras eram Enteritidis, 20 (16,5%) Typhimurium, 11 (9,1%) Infantis, 8 (6,6%) Braenderup e 8 (6,6%) Schwarzgrund. Os demais sorotipos foram identificados em 15 casos demonstrando uma frequência percentual acumulada de 12,4%. A realização da detecção molecular específica por PCR confirmou a ocorrência de todos os casos de Enteritidis e Typhimurium.

O presente estudo demonstra a elevada ocorrência do sorotipo Enteritidis em alimentos. Estudo anterior (CAPALONGA et al., 2014), também conduzido no RS entre 2007

a 2012, demonstrou que o sorotipo Enteritidis apresentava uma frequência ainda mais elevada entre as salmonelas isoladas de alimentos (84,7%). Mas nossos resultados divergem com relação às frequências dos sorotipos Typhimurium n= 20 (16,5%), Infantis n= 11 (9,1%) e Schwarzegrund n= 8 (6,6%), onde no estudo de Capalonga et al., (2014) foram observados n= 6 (3,7%), n= 1 (0,6%) e n= 9 (5,5%), respectivamente. Os demais sorotipos estavam presentes em 23 (19%) isolados, em contrapartida de 9 (5,5%) verificados na pesquisa de Capalonga et al., (2014). Neste aspecto, Geimba et al., (2004) identificaram a presença do sorotipo Enteritidis em 97% dos alimentos avaliados no período de 1999 a 2000 no RS. Posteriormente, de Oliveira et al., (2006) evidenciaram o envolvimento de salmoneloses em 93% dos casos com sorotipo Enteritidis na temporada 2001-2002. De Paula et al., (2011) relacionaram Enteritidis com percentual de 87% entre os anos de 2003 a 2006. Estes resultados denotam que o sorotipo Enteritidis é o mais frequentemente encontrado no estado do RS, este fato foi visualizado no nosso estudo, contudo com frequências menores n= 59 (48,8%).

Isolados de Enteritidis foram relacionados com percentuais elevados de salmoneloses alimentares em outros estados do Brasil como, por exemplo, São Paulo (TAVECHIO et al., 2002), Paraná (KOTTWITZ et al., 2008) e Santa Catarina (KOERICH et al., 2010). Em um âmbito internacional o mesmo sorotipo foi considerado como primordial agente responsável por toxinfecções alimentares na China (HE et al., 2011) e nos Estados Unidos (CHO et al., 2010).

Em comparação com o estudo de Capalonga et al., (2014) foram verificados semelhanças no aspecto de alimentos contaminados em 26 (21,5%) x 24 (17,4%) amostras de saladas de maionese, 16 (13,2%) x 17 (12,3%) de carne bovina e 7 (5,8%) x 9 (6,5%) de carne de frango e seus derivados. Em contraponto, frequências diferentes foram observadas nos alimentos de *fast-foods* 15 (12,4%) x 8 (5,8%) e carne suína e seus derivados 14 (11,6%) x 3 (2,2%). Os estudos de Costalunga e Tondo (2002) e Silveira e Tondo (2006) também destacaram que salada de maionese foi o alimento mais relacionado com salmoneloses.

Os ensaios de PCR Multiplex permitiram a confirmação da presença dos sorotipos de Enteritidis e Typhimurium, fato este que está de acordo com o estudo de Maurischat *et al.*, (2015). Neste sentido, as aplicações dos métodos que visam à análise de DNA possibilitam melhores desempenhos e dinamismo comparados às metodologias tradicionais de sorotipagens de salmonelas (WATTIAU et al., 2011).

CONCLUSÃO

Este estudo permitiu o entendimento das distribuições dos sorotipos de Salmonelas no estado do RS. Além disso, forneceu dados descritivos sobre a contaminação dos alimentos e a distribuição dos casos de salmoneloses em 36 cidades do RS. O sorotipo Enteritidis foi o mais evidente, o que está de acordo com a literatura, no entanto apresentou menores frequências quando comparado com diferentes estudos. Destacaram-se também as frequências dos demais sorotipos analisados, como por exemplo, Typhimurium, Infantis, Braenderup e Schwarzegrund. Os sorotipos de Enteritidis e Typhimurium foram confirmados pela análise de material genético, no qual possui potencial maior de flexibilidade e dinâmica em relação aos métodos tradicionais.

REFERÊNCIAS

ACHTMAN, M; WAIN, J; WEILL, F.X, *et al.* Multilocus sequence typing as a replacement for serotyping in *Salmonella enterica*. **PloS Pathog.**, v. 8, n. 6, p. 1-19, 2012.

BERCHIERI, J.A; OLIVEIRA, O.C. Salmoneloses. In: Berchieri JA, Macari M. **Doenças das aves**. Campinas: FACTA, 2010: pag. 435-54.

CAPALONGA, R; RAMOS, R.C; BOTH, J.M, et al. Salmonella serotypes, resistance patterns, and food vehicles of salmonellosis in southern Brazil between 2007 and 2012. **J Infect Dev Ctries.**, v. 8, n. 7, p. 811-817, 2014.

CDC. **National Salmonella Surveillance Overview**. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services, CDC, 2011. Disponível em: http://www.cdc.gov/nationalsurveillance/PDFs/NationalSalmSurveilOvervie_w_508.pdf. Acesso em: maio de 2016.

CHO, S; WHITTAM, T.S; BOXRUD. D.J, et al. Use of multiple-locus variable number tandem repeat analysis and phage typing for subtyping of Salmonella Enteritidis from sporadic human cases in the United States. **J Appl Microbiol.**, v. 108, p. 859-867, 2010.

COSTALUNGA, S; TONDO, E.C. Salmoneloses in Rio Grande do Sul, 1997 a 1999. **Brazilian Journal of Microbiology.**, v. 33, p. 342-346, 2002.

DE OLIVEIRA, F.A; BRANDELI, A; TONDO, E.C. Antimicrobial resistance in Salmonella Enteritidis from foods involved in human salmonellosis outbreaks in southern Brazil. **New Microbiol.**, v. 29, p. 49-54, 2006.

DE PAULA, C.M.D.; RITTER, A.C.; PIETA, L, et al. Antimicrobial resistance in Salmonella enteritidis from foods involved in human salmonellosis outbreaks in southern Brazil from 2003 to 2006. **J Microbiol Antimicrob**, v.3, p.233-240, 2011.

GAST, R.,K; SHIVAPRASAD, H.L; BARROW, P.A. Salmonella Infections. In: SAIF, Y.M; FADLY, A.M; GLISSON, J.R.;MCDUGALD, L.R; NOLAN, L.K; SWAYNE, D.E (ed). **Diseases of Poultry**. 12a ed. Blackwell Publishing, p.619-674, 2008.

GEIMBA, M.P; TONDO, E.C; DE OLIVEIRA, F.A; CANAL, C.W; BRANDELLI, A. Serological characterization and prevalence of spvR genes in Salmonella isolated from foods involved in outbreaks in Brazil. **J Food Prot.**, v.67, p.1229-1233, 2004.

GRIMONT, P.A.D; WEILL, F. **Antigenic Formulae of the Salmonella Serovars**. 9a ed. Paris: WHO Collaborating Center for Reference and Research on Salmonella. Paris: Institut Pasteur, 2007.

GUIBOURDENCHE, M; ROGGENTIN, P; MIKOLEIT, M., et al. Supplement 2003-2007 (No. 47) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. **Res Microbiol**, v.1, n.161, p. 26–29, 2010.

HE, G-Z; FENG, Y; TIAN, W-I; et al. Populations of Salmonella Enteritidis in Orally Infected White Chinese Goose. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 10, p.2234-2239, 2011.

HOORFAR, J.; BAGGESEN, D.L.; PORTING, P.H.,. A PCR-based strategy for simple and rapid identification of rough presumptive Salmonella isolates. **J. Microbiol. Methods**, v.35, p.77–84, 1999.

IKUTA, N; FONSECA, A; LUNGE, V. **Diagnóstico molecular**. In: Berchieri A, Silva EM, di Fábio J, et al (ed). Doenças das aves. 2ª ed. Campinas: Facta, p.105-119, 2009.

ISSENHUTH-JEANJEAN, S.; ROGGENTIN, P.; MIKOLEIT, M, et al. Supplement 2008-2010 (no. 48) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. **Res Microbiol.**, v. 165, n. 7, p. 526–530, 2014.

KOERICH, G.M.D; DE LUCA, A.N.B; PHILIPPI, J.M.S, et al. (2010) Análise dos surtos de DTA causados por Salmonella sp em Santa Catarina, Brasil, de 2006 a 2008. D. **Ciências da Saúde - 3**.

Saúde Coletiva - 4. Saúde Pública. 62ª Reunião Anual da SBPC. Disponível: <http://www.sbpnet.org.br/livro/62ra/resumos/resumos/1078.htm>. Acesso: maio de 2016.

KOTTWITZ, L.B.M; BACK, A; LEÃO, J.A, et al. Contaminação por *Salmonella* spp. em uma cadeia de produção de ovos de uma integração de postura comercial. **Arq Bras Med Vet Zootec.** v.60, p.496-498, 2008.

MAJOWICZ, S.E; MUSTO, J.; SCALLAN, E. et al. The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. **Clin. Infect. Dis.**, v.50, p.882–889, 2010.

MAURISCHAT, S; BAUMANN, B; MARTIN, A; MALORNY, B. Rapid detection and specific differentiation of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Enteritidis, Typhimurium and its monophasic variant 4,[5],12:i:- by real-time multiplex PCR. **Int J Food Microbiol**, v.193, p.8-14, 2015.

TAVECHIO, A.T; GHILARDI, Â.C.R; PERESI, J.T.M, et al. *Salmonella* serotypes isolated from nonhuman sources in São Paulo, Brazil, from 1996 through 2000. **J Food Prot**, v.65, p.1041-1044, 2002.

SCHROEDER, C.M; LATIMER, H.K; SCHLOSSER, W.D, et al. Overview and summary of the Food Safety and Inspection Service risk assessment for *Salmonella enteritidis* in shell eggs, October 2005. **Foodborne Pathog Dis.**, v.3, n.4, p.403–12, 2006.

SILVEIRA, J.B; TONDO, E.C. **Salmonellosis outbreaks occurred in Rio Grande do Sul, Southern Brazil, during 2000 to 2001.** In: International Symposium *Salmonella* and salmonellosis. Epidemiology and Public Health. Saint Malo, France, Sessão 5, Editora: Pierre Colin e Geneviève Clément p.521-522, 2006.

SOUMET, C.; ERMEL, G; FACH, P, et al. Evaluation of different DNA extraction procedures for the detection of *Salmonella* from chicken products by polymerase chain reaction. **Lett App Microbiol**, v.19, n.5, p.294-298, 1994.

WATTIAU, P; BOLAND, C; BERTRAND, S. Methodologies for *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* suotyping: gold standards and alternatives. **Appl Environ Microbiol**, v.77, n.22, p.7877-7885, 2011.