



DETECÇÃO DE *SALMONELLA* DOS SOROTIPOS ENTERITIDIS, HEIDELBERG E TYPHIMURIUM PELO SEQUENCIAMENTO DO OPERON *rrnH*.

Walesca Borcati^{1,4}
Diéssy Kipper⁴
Fernanda Kieling Moreira Lehman⁴
Silvia De Carli⁵
Vagner Lunge^{2,4}
Nilo Ikuta^{3,4}

As salmonelas são bactérias patogênicas que causam doenças no homem e em animais domésticos. Estas bactérias são gram negativas, possuem formato de bastão e pertencem ao gênero *Salmonella*, família *Enterobacteriaceae*. Os isolados são normalmente classificados em sorotipos, conforme combinações de antígenos de superfície somáticos (O) e flagelares (H). A ocorrência dos sorotipos de *Salmonella* varia entre localidades, regiões e países. Portanto, a identificação do sorotipo é importante na compreensão da epidemiologia da *Salmonella*, fornecendo informações essenciais sobre a distribuição geográfica e disseminação temporal de linhagens desta bactéria. A análise do sorotipo também é importante para a caracterização de doenças, na medida em que a grande maioria das infecções severas são causadas por sorotipos específicos, como Enteritidis, Typhimurium e Heidelberg. A detecção de *Salmonella* é realizada pelo isolamento bacteriano e caracterização bioquímica. A identificação de sorotipos necessita de ensaios com reagentes (anti-soros) específicos. Metodologias moleculares podem ser utilizadas na detecção de *Salmonella* e dos sorotipos. O presente trabalho objetivou estabelecer uma metodologia de sequenciamento de região genética (*operon rrnH*) para identificação de sorotipos de *Salmonella*. Foram obtidos 57 isolados de *Salmonella* de diferentes sorotipos. O DNA destes isolados foi submetido à amplificação de região intergênica do *operon rrnH* por PCR. Os amplicons foram avaliados por eletroforese em gel de poliacrilamida e após submetidos ao sequenciamento de DNA. A sequência nucleotídica de cada isolado foi avaliada e comparada com sequências do GENBANK através da ferramenta BLASTn. Houve elevada concordância (mais de 90%) entre os resultados de detecção tradicional dos sorotipos e o sequenciamento do operon *rrnH*.

Palavras Chave: PCR, *Salmonella* spp, Diagnóstico molecular.

1 Aluno do curso de graduação de Medicina Veterinária da ULBRA – Bolsista CNPq – wborcati@hotmail.com

2 Professor do curso de graduação de Medicina Veterinária e do PPGBIOSAÚDE – vagner.lunge@gmail.com

3 Professor do curso de graduação de Medicina Veterinária e do PPGBIOSAÚDE - ikuta.ulbra@gmail.com

4 Laboratório de Diagnóstico Molecular – ULBRA

5 Mestranda em Medicina Veterinária da UFRGS

INTRODUÇÃO

A *Salmonella* é um dos mais importantes agentes bacterianos que tem a capacidade de ocasionar doenças entéricas no homem e em animais domésticos (SCHROEDER et al., 2006). Trata-se de uma das bactérias mais estudadas, seja em aspectos fisiológicos, bioquímicos, genéticos ou celulares (DARWIN; MILLER, 1999). A *Salmonella* é tipicamente encontrada em todos os animais domésticos e a bactéria pode ser transmitida ao homem pela ingestão de alimentos contaminados (WHO, 2002). Consequentemente a salmonelose é uma das principais doenças transmitidas por alimentos, principalmente de origem animal, como ovos, carnes e produtos avícolas. As aves são contaminadas pela presença da bactéria no meio ambiente de criação ou abate destes animais (MAJOWICZ et al., 2010; MOUSSA et al., 2013; MOHAMED et al., 2014).

O gênero *Salmonella* pertence à família *Enterobacteriaceae*. Duas espécies são conhecidas: *S. enterica*, que é composta de seis subespécies (*enterica*, *salame*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica*) e *S. bongori* (MURRAY et al., 1999). O gênero também é classificado em vários sorotipos, sendo que alguns têm maior frequência nas salmoneloses animais, como Typhimurium, Hadar, Heidelberg, Infantis e Enteritidis (AUGUSTO et al., 2011). Os principais sorotipos causadores da doença em humanos são Enteritidis e Typhimurium (MOUSSA et al., 2013). A relação completa de sorotipos e respectivas fórmulas antigênicas está descrita em um documento denominado *Kauffmann- White-Le Minor* (KWL) (INSENHUTH-JEANJEAN et al., 2014; GUIBOURDENCHE et al., 2010). Cada sorotipo possui uma fórmula antigênica, na qual os diferentes antígenos somáticos (O) são identificados com números e os antígenos flagelares (H) são expressos em letras e números. (GRIMONT et al., 2007)

O genoma das salmonelas possui um DNA principal de dupla fita e circular (cromossomal) entre 4,5 e 5,0 Mbp, além de eventuais moléculas de DNA menores com capacidade de auto replicação (plasmídeos) (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008). O genoma é organizado em *operons*, arranjo evidenciado para os genes de RNAs ribossomais (rRNAs) e de transferência (tRNAs) (MARQUES, 2012). A *S. enterica* possui ao menos sete destes *operons* de rRNAs e tRNAs, que são representados por letras (ABDCDEFGH) (LIU et al., 1998). Entre os genes de rRNA 16S e 23S de todos os *operons* *rrn* de *Salmonella* existe uma região espaçadora intergênica (ISR), que normalmente compreende genes de tRNA e regiões não codificadoras (PULIDO-LANDÍNEZ et al., 2014; GUARD et al., 2012).

Os métodos de diagnóstico clássicos se limitam ao isolamento bacteriano e caracterização bioquímica, sendo pouco significativo em relação a diferenciação de sorotipos (FABRE et al., 2012; GUARD et al., 2012; PULIDO-LANDÍNEZ et al., 2014). Os métodos de diagnóstico molecular, utilizados para detecção e caracterização de *Salmonella*, têm sido implementados para sorotipagem. Este trabalho tem como objetivo implementar o sequenciamento das ISRs do *operon* *rrnH*, a fim de caracterizar os isolados de *Salmonella* dos sorotipos Enteritidis, Typhimurium e Heidelberg.

METODOLOGIA

Amostras: foram obtidos 57 isolados de *Salmonella* provenientes de culturas bacterianas de alimentos, humanos e aves, coletadas em um período de 2010 – 2016. Estas amostras foram previamente sorotipadas pelo Laboratório Central de Saúde Pública do Rio Grande do Sul (LACEN) (humanos e alimentos) e por laboratórios vinculados as granjas (aves).

Métodos: A extração de DNA das amostras foi realizada por fervura (SOUMET et al., 1994). A primeira amplificação foi realizada por PCR em tempo real em equipamento *StepOne Plus* (Applied Biosystems, Carlsbad CA, EUA), tendo como alvo o gene *invA* e as seguintes condições: um ciclo de desnaturação inicial de 3 minutos a 95°C, seguido de 40 ciclos de 15s a 95°C e 60s a 60°C, conforme previamente descrito (HOORFAR et al., 2000).

Após foi realizada a amplificação das regiões intergênicas (ISR) do *operon rrnH* utilizando os *primers* ITR 1-2 NF (5' CGATGCGTTGAGCTAACCGG 3') e ITR 3 NR (5' CAGAAGCGATAACCACGTCGTC 3') (MORALES et al., 2006). A reação foi realizada no equipamento *Veriti 96Well Thermal Cycler* (Applied Biosystems, Carlsbad CA, EUA) com as seguintes condições: 40 ciclos de desnaturação por 20s a 95°C, anelamento por 40s a 60°C e extensão por 60s a 72°C convencional. Os produtos de PCR foram submetidos à detecção por eletroforese em gel de poliacrilamida corado com nitrato de prata. Os amplicons das amostras positivas para o *operon rrnH* foram submetidas à purificação através do *Kit NewGene Preamp* (Symbios Biotecnologia, Cachoeirinha RS, Brasil) e quantificação por eletroforese em gel de agarose. Os DNAs das amostras positivas para o *operon rrnH* foram encaminhados para sequenciamento pelo método de Sanger, o resultado deste sequenciamento foi comparado com as referências de sorotipos de *Salmonella* que estão depositadas no GenBank, pelo programa BLASTn.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para as 57 amostras foram obtidos fragmentos entre 550 e 800 pb. O resultado do sequenciamento do *operon rrnH* possibilitou confirmar o tamanho exato dos fragmentos de cada amostra, analisar a sequência nucleotídica de cada isolado e comparar com sequências depositadas no GENBANK através da ferramenta BLASTn. Isolados dos sorotipos Typhimurium (9), Heidelberg (4) e Enteritidis (10) apresentaram resultados com 100% de identidade com dados de cepas de referência de Typhimurium, 99-100% de identidade com dados Heidelberg e 100% de identidade com dados de Enteritidis.

A pouca disponibilidade de testes de diagnóstico que caracterizem de maneira rápida e eficiente os isolados de *Salmonella* diminuem a probabilidade de um tratamento e controle eficazes, sobre a mudança de padrões de distribuição, características e fontes potenciais de infecção (PULIDO- LANDÍNEZ et al., 2014). Os métodos utilizados neste trabalho, como a amplificação e sequenciamento do *operon rrnH* tornaram possível realizar a distinção entre sorotipos Typhimurium, Heidelberg e Enteritidis.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A identificação dos sorotipos de *Salmonella* são extremamente importantes com o intuito de se estabelecer a caracterização de cada isolado, se realizado de forma padrão, ou seja, por métodos bioquímicos ou por isolamento bacteriano, torna-se um pouco limitado a determinação da ausência ou presença de *Salmonella* spp, além de demorarem um tempo significativo para sua realização, o que faz com que o tratamento e controle das doenças sejam dificultoso. Os métodos moleculares são mais rápidos para a identificação da bactéria em questão, sendo aplicáveis e importantes para uma caracterização eficiente dos diversos isolados de *Salmonella*.

REFERÊNCIAS

- MEDEIROS, Marcelo Augusto Nunes et al. Prevalence and antimicrobial resistance of Salmonella in chicken carcasses at retail in 15 Brazilian cities. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 30, n. 6, p. 555-560, 2011.
- DARWIN, K. Heran; MILLER, Virginia L. Molecular Basis of the Interaction of Salmonella with the Intestinal Mucosa. **Clinical microbiology reviews**, v. 12, n. 3, p. 405-428, 1999.
- FABRE, Laëtitia et al. Correction: CRISPR Typing and Subtyping for Improved Laboratory Surveillance of Salmonella Infections. **PloS one**, v. 7, n. 11, 2012.
- GRIMONT, Patrick AD et al. Antigenic formulae of the Salmonella serovars. **WHO collaborating centre for reference and research on Salmonella**, v. 9, 2007.
- GUARD, Jean et al. Comparison of dkgB-linked intergenic sequence ribotyping to DNA microarray hybridization for assigning serotype to Salmonella enterica. **FEMS microbiology letters**, v. 337, n. 1, p. 61-72, 2012.
- GUIBOURDENCHE, Martine et al. Supplement 2003–2007 (No. 47) to the white-Kauffmann-Le minor scheme. **Research in microbiology**, v. 161, n. 1, p. 26-29, 2010.
- ISSENHUTH-JEANJEAN, Sylvie et al. Supplement 2008–2010 (no. 48) to the White–Kauffmann–Le Minor scheme. **Research in microbiology**, v. 165, n. 7, p. 526-530, 2014.
- LIU, Shu-Lin; SANDERSON, Kenneth E. Homologous recombination between rrn operons rearranges the chromosome in host-specialized species of Salmonella. **FEMS microbiology letters**, v. 164, n. 2, p. 275-281, 1998.
- MAJOWICZ, Shannon E. et al. The global burden of nontyphoidal Salmonella gastroenteritis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 50, n. 6, p. 882-889, 2010.
- MARQUES, Marilis do Valle. **Biologia molecular e genética bacteriana**. Sociedade Brasileira de Ganética. 1ª ed. Ribeirão Preto: Cubo, 2012, p.348.
- MOHAMED, Tagelsir et al. Molecular characterization of antibiotic resistant Salmonella Typhimurium and Salmonella Kentucky isolated from pre-and post-chill whole broilers carcasses. **Food microbiology**, v. 38, p. 6-5, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2013.08.002>>.
- MORALES, Cesar A.; GAST, Richard; GUARD-BOULDIN, Jean. Linkage of avian and reproductive tract tropism with sequence divergence adjacent to the 5S ribosomal subunit rrfH of Salmonella enterica. **FEMS microbiology letters**, v. 264, n. 1, p. 48-58, 2006.
- MOUSSA, Ihab Mohamed et al. Molecular characterization of Salmonella virulence genes isolated from different sources relevant to human health. **Journal of Food, Agriculture & Environment**, v. 11, n. 2, p. 197-201, 2013.
- PULIDO-LANDÍNEZ, Martha et al. Serotype and antimicrobial resistance patterns of Salmonella isolates from commercial birds and poultry environment in Mississippi. **Avian diseases**, v. 58, n. 1, p. 64-70, 2013.
- SCHROEDER, Carl M. et al. Overview and summary of the Food Safety and Inspection Service risk assessment for Salmonella enteritidis in shell eggs, October 2005. **Foodborne Pathogens & Disease**, v. 3, n. 4, p. 403-412, 2006.

SOUMET, C. et al. Evaluation of different DNA extraction procedures for the detection of Salmonella from chicken products by polymerase chain reaction. **Letters in applied microbiology**, v. 19, n. 5, p. 294-298, 1994.

TRABULSI, Luis Rachid; ALTERTHUM, Flávio. **Microbiologia**. 5. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2008.

World Health Organization, Food and Agriculture Organization of the United Nations. Risk assessments of Salmonella in eggs and broiler chickens. Series no. 2, Geneva: WHO; 2002. P. 328. Disponível em: < <http://www.fao.org/DOCREP/005/Y4392E/y4392e00.htm> > Accessed 27 January 2016.