

IDENTIFICAÇÃO DE SOROTIPOS DE *SALMONELLA* POR RIBOTIPAGEM

Diéssy Kipper¹, Fernanda Kieling Moreira Lehmann¹, Nilo Ikuta¹ e Vagner Ricardo Lunge¹

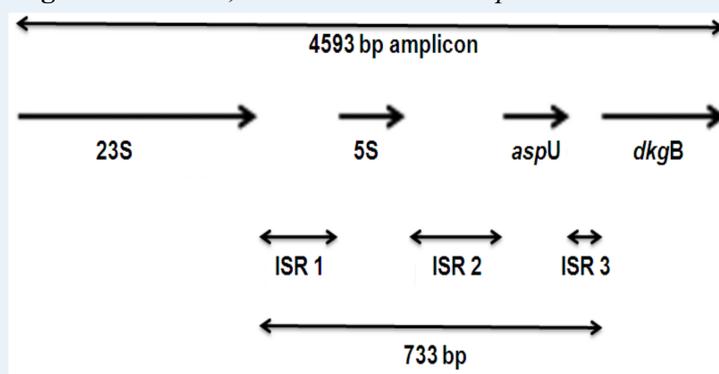
¹ Laboratório de Diagnóstico Molecular, Universidade Luterana do Brasil
diessykipper@hotmail.com

INTRODUÇÃO

A *Salmonella* está entre as principais bactérias envolvidas nos surtos de doença avícolas pelo mundo (Moreira, 2001). Os diagnósticos disponíveis para a detecção da bactéria *Salmonella*, muitas vezes se limitam à determinação da presença ou ausência de *Salmonella* spp.

Metodologias moleculares têm sido utilizadas na identificação de *Salmonella*. A ribotipagem de regiões espaçadoras intergênicas (ISRs – *intergenic space regions*), principalmente nos operons dos genes de RNAs ribossomais (rRNA) e de transferência (tRNA), é um método rápido e tem sido utilizado para identificação de bactérias em nível de espécie. Procedimento proposto mais recentemente e que analisa duas regiões intergênicas (genes de rRNAs 23S e 5S e do tRNA *aspU*) demonstrou a possibilidade de identificação de cepas de *Salmonella* (Guard et al., 2012). Estes genes estão organizados no operon *rrnH* (Figura 1) e dividem o mesmo sistema regulatório (Darini et al., 1998). As ISRs 1, 2 e 3 do operon *rrnH* apresentam variabilidade de tamanho e sequência e são capazes de fornecer informações sobre variações genotípicas sutis e até identificação de sorotipo. Além disso, este método é mais rápido que a sorotipagem tradicional e tem mostrado alto poder de distinção, reprodutibilidade e repetibilidade (Pulido-Landinez et al., 2013; Morales et al., 2006).

Figura 1: ISR's 1, 2 e 3 localizadas no operon *rrnH*.

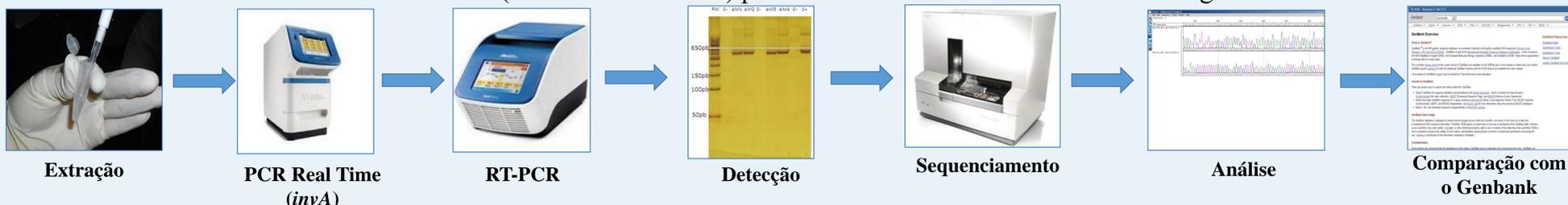


OBJETIVO

A proposta do estudo foi avaliar a ribotipagem da região do operon *rrnH* para identificação de sorotipos de *Salmonella* isolados de aves do Brasil.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram analisados 12 isolados de *Salmonella* (culturas bacterianas) provenientes de laboratórios de bacteriologia.



RESULTADOS

As 12 amostras amplificaram para o gene *invA* pela PCR em tempo real e para o operon *rrnH* pelo nested-PCR convencional. Na avaliação pela eletroforese em gel de poliacrilamida foram observadas variações de tamanho dos amplicons. A análise das sequências completas demonstrou a ocorrência de deleções/inserções e permitiu avaliar o tamanho de cada ISR (Tabela 1). Além disso, a análise dos polimorfismos de nucleotídeos possibilitou avaliar a similaridade entre os sorotipos analisados neste estudo com amostras de referência. A avaliação de similaridade demonstrou que, independentemente da ISR, isolados de mesmo sorotipo apresentam maior identidade genética. Na comparação entre as ISRs, a ISR 2 é a região com maior variabilidade e conseqüentemente melhor potencial para a discriminação dos sorotipos, corroborando o estudo de Morales et al. 2006 (Figura 2).

Tabela 1: Amostras utilizadas para a análise da ISR.

Amostra	Sorotipo	Procedência	Tipo de exploração	<i>invA</i>	ISR1	ISR2	ISR3
					(bp)		
1	Enteritidis	NI	NI	+	185	191	164
2	Enteritidis	RS	Codornas	+	185	191	164
3	Enteritidis	GO	Galinha - Matrizes Pesada	+	185	191	94
4	Pullorum	SC	Frango de Corte	+	184	54	164
5	Pullorum	RS	Frango de Corte	+	184	54	164
6	Typhimurium	SP	Genética	+	185	191	94
7	Typhimurium	RS	Frango de Corte	+	184	191	164
8	Typhimurium	RS	Galinha - Recria Caipira	+	184	191	164
9	Gallinarum	RS	Galinha - Matrizes Pesada	+	184	191	164
10	Gallinarum	RS	Matriz Frango de Corte	+	184	191	163
11	Salm. Grupo "D"	BA	Frango de Corte	+	191	53	164
12	Salm. Grupo "D"	DF	Galinha - Matrizes Pesada	+	191	53	164

*NI - não informado.

Figura 2: Percentual de similaridade entre os sorotipos ISR.

		ISR 2																			
		2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
1	S. Gallinarum AM933173	21	22	35	35	35	35	41	41	41	41	41	21	21	20	20	68	40	40	35	28
2	S. Paratyphi AL513382		17	26	26	26	27	21	21	21	21	21	91	91	80	80	37	21	21	26	15
3	S. Bongori			39	39	39	39	41	41	41	41	17	17	17	17	87	41	41	39	26	
4	S. Typhimurium (7)				100	100	98	92	92	92	92	28	28	23	73	91	91	100	44		
5	S. Typhimurium (6)					100	98	92	92	92	92	28	28	23	73	91	91	100	44		
6	S. Typhimurium (8)						98	92	92	92	92	28	28	23	73	91	91	100	44		
7	S. Typhimurium AE006468							92	92	92	92	26	26	23	72	91	91	98	44		
8	S. Heidelberg CP005995								100	100	100	100	21	21	20	73	99	99	92	45	
9	S. Enteritidis (2)									100	100	100	21	21	20	98	99	99	92	45	
10	S. Enteritidis (3)										100	100	21	21	20	98	99	99	92	45	
11	S. Enteritidis (1)											100	21	21	20	98	99	99	92	45	
12	S. Enteritidis AM933172												100	21	21	20	98	99	99	92	45
13	S. Pullorum CP006575													100	83	83	100	21	21	28	15
14	S. Pullorum (5)														83	83	100	21	21	28	15
15	S. Grupo D (11)															100	93	20	20	23	14
16	S. Grupo D (12)																93	20	20	23	14
17	S. Pullorum (4)																	28	28	21	15
18	S. Gallinarum (9)																		100	91	45
19	S. Gallinarum (10)																			91	45
20	S. Newport CP010280																				44
21	S. Choleraesuis AE017220																				

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Darini, C. L. A. et al. Aplicação da ribotipagem na epidemiologia molecular de infecções bacterianas. Ribeirão preto: Medicina, 73-80, 1998.
- Guard, J. et al. Comparison of *dkgB*-linked intergenic sequence ribotyping to DNA microarray hybridization for assigning serotype to *Salmonella enterica*. Federation of European Microbiological Societies – Microbiology Letters 337:61-72. 2012.
- Morales, C. A. et al. Linkage of avian and reproductive tract tropism with sequence divergence adjacent to the 5S ribosomal subunit *rrfH* of *Salmonella enteric*. Federation of European Microbiological Societies – Microbiology Letters 264:48-58. 2006.
- Moreira, A. P. O. Pesquisa de *Salmonella* SPP. Em frangos de corte de um dia de idade da região metropolitana de Fortaleza-CE. Publicado em 2001. Disponível em: <www.uece.br/ppgvc/dmdocuments/anamoreira.pdf> Acesso em: 31 jan 2015.
- Pulido-Landinez, M. et al. Assignment of serotype to *Salmonella enterica* isolates obtained from poultry and their environment in Southern Brazil. Letters in Applied Microbiology 57:288-295. 2013.

CONCLUSÕES

A utilização do método de ribotipagem para a análise da região intergênica mostrou-se eficiente na discriminação de sorotipos de *Salmonella*.