



## IDENTIFICAÇÃO DE SOROTIPOS DE *SALMONELLA* POR RIBOTIPAGEM

Diéssy Kipper<sup>1</sup>  
Fernanda Kieling Moreira Lehmann<sup>2</sup>  
Nilo Ikuta<sup>3</sup>  
Vagner Ricardo Lunge<sup>4</sup>

### Resumo

O potencial de discriminação dos sorotipos de *Salmonella* por análise da sequência dos genes 5S, 23S, *aspU*, *dkgB* e das regiões intergênicas, foi investigado através da ribotipagem. As 12 cepas de 5 sorotipos diferentes de *Salmonella* foram sequenciadas a partir do DNA amplificado por reação em cadeia da polimerase e comparadas com sequências de referência depositados no GenBank. 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. O método de ribotipagem para a análise da região intergênica mostrou-se eficiente na discriminação de sorotipos de *Salmonella*.

Palavras chave: Sequenciamento; Região Intergênica; Aves

### INTRODUÇÃO

*Salmonella* é uma das principais bactérias isoladas de aves (Moreira, 2002). Estas bactérias podem causar doenças nas próprias aves ou mesmo serem transmitidas ao homem pelo consumo de produtos contaminados. O gênero *Salmonella* é dividido em espécies, subespécies e milhares de sorotipos (Júnior e Neto, 2009). As salmonelas que infectam aves são geralmente da espécie *Salmonella enterica* subespécie *enterica* e de um número menor de sorotipos (aproximadamente 100). Alguns destes sorotipos causam doenças apenas em aves (como por exemplo Gallinarum e suas biovars Gallinarum e Pullorum), enquanto outros infectam uma gama maior hospedeiros (como Typhimurium, Enteritidis, Heidelberg, etc.).

Os diagnósticos disponíveis para a detecção da bactéria *Salmonella* muitas vezes se limitam à determinação da presença ou ausência de *Salmonella* spp pelo isolamento bacteriano e caracterização bioquímica. A identificação de cada sorotipo, essencial para a caracterização do isolado, envolve uma série de antisoros e pode ser demorada. A falta de métodos capazes de identificar os sorotipos de *Salmonella* de maneira eficaz e rápida pode impedir o tratamento adequado e o controle da mesma (Guard et al., 2012).

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

---

1 Aluno do curso de graduação Medicina Veterinária – Bolsista PIBIC/CNPq

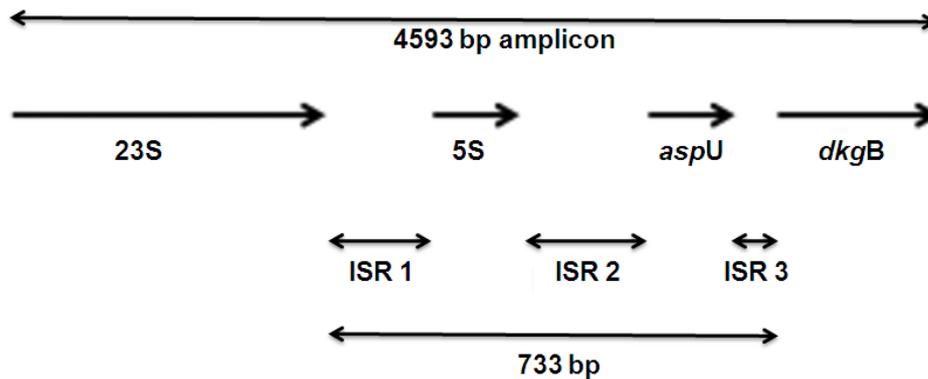
2 Laboratório de Diagnóstico Molecular – fernandakieling@gmail.com

3 Professor do PPGBioSaúde e Medicina Veterinária – ikuta.ulbra@gmail.com

4 Professor do PPGBioSaúde e Medicina Veterinária – vagner.lunge@gmail.com

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*. A ISR1 é definida por 184bp e está localizada no final do gene ribossomal 23S e o início do gene 5S. A ISR 2 é de 229bp e está localizada no final do gene ribossomal 5S e no início do gene *aspU*. A ISR 3 é de 167bp e está localizada no final do gene *aspU* e início do gene *dkgB*.



Fonte – Autores

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

## METODOLOGIA

Foram analisados 12 isolados de *Salmonella* (culturas bacterianas) obtidos de propé, fezes, *swab* de cloaca e cama, vísceras, caldo de fígado e cultura sólida, das aves. Tais amostras eram provenientes de laboratórios de bacteriologia e haviam sido previamente sorotipadas como Enteritidis (3 isolados), Typhimurium (3 isolados), Gallinarum (2 isolados), Pullorum (2 isolados) e sorogrupo D (2 isolados).

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 foi retirada do meio sólido e adicionada a 100 µl de água tratada, em seguida a solução foi colocada no termobloco por 5 minutos a 100°C. Por conseguinte, passou por um choque térmico e foi depositada na centrífuga por 3 minutos a 10000 rpm. Por fim, o sobrenadante foi utilizado para o ensaio de amplificação.

A confirmação do gênero *Salmonella* foi realizada pela amplificação do gene *invA* através da PCR em tempo real (*StepOne Plus - Applied Biosystems*), utilizando 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. A avaliação foi realizada diretamente no equipamento pela análise da presença de curvas de amplificação e determinação dos respectivos valores de Ct (*cycle threshold*).

Amostras confirmadas foram submetidas à amplificação por nested-PCR convencional (*Veriti 96 Well Thermal Cycler - Applied Biosystems*) utilizando os primers descritos na Tabela 1. O programa de PCR incluiu as seguintes condições um ciclo de desnaturação inicial de 10 segundos a 94°C, 30 ciclos de desnaturação por 20 segundos a 94°C, anelamento por 40 segundos a 50°C, extensão por 40 segundos a 72°C e 1 ciclo de extensão final a 72°C por 5min (1ª amplificação); um ciclo de desnaturação inicial de 10 segundos a 94°C, 20 ciclos de desnaturação por 20 segundos a 94°C, anelamento por 40

segundos a 55°C, extensão por 40 segundos a 72°C e 1 ciclo de extensão final a 72°C por 5min (2ª amplificação – nested).

Tabela 1: Primers utilizados para ISR-PCR.

Primer	Orientação	Sequência do primer (5'→3')	Tamanho amplicon (bp)
ITR 1-2 1 <sup>a</sup> F	Forward	GATAGGCCGGGTGTGTAAGC	957pb
ITR 3 1 <sup>a</sup> R	Reverse	CTGTCCAACAGCCGCTTCATTATC	
ITR 1-2 NF	Forward	CGATGCGTTGAGCTAACCGG	856pb
ITR 3 NR	Reverse	CAGAAGCGATAACCACGTCGTC	

Os produtos de PCR foram submetidos à detecção por eletroforese em gel de poliacrilamida corada com nitrato de prata. As amostras positivas foram purificadas através do método de sílica utilizando o *Kit NewGene Preamp* (Simbios Biotecnologia – Cachoeirinha – Brasil), quantificadas por eletroforese em gel de agarose.

Depois de purificadas e quantificadas, as amostras foram sequenciadas pelo método de Sanger e comparadas com sequências de referência de sorotipos de *Salmonella* depositadas no banco de dados do GenBank (Morales et al., 2006). As sequências de nucleotídeos foram analisadas, editadas e alinhadas através do software GENEIOUS® v8.1.6 (Biomasters, www.geneious.com). As sequências foram aparadas para incluir somente a ISR 1 entre os genes 23S e 5S, a ISR 2 entre os genes 5S e o *aspU* e a região ISR 3 entre os genes *aspU* e *dkgB*. Posteriormente, foi realizada a análise de similaridade entre as sequências obtidas no presente estudo e as de referência.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

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 2). Além disso, a análise dos polimorfismos de nucleotídeos possibilitou avaliar a similaridade entre os sorotipos analisados neste estudo com amostras de referência (Figura 2).

Na ISR 1, quatro das 12 amostras analisadas apresentaram um fragmento de 185 bp, seis amostras com 184bp e duas amostras com 191bp, o que confere com dados de Morales et al. 2006, onde tal ISR apresentou 178/179bp nos diversos sorotipos investigados. Já na ISR 2, oito das 12 amostras sequenciadas continham 191bp, duas amostras com 45bp e outras duas com 53bp. As cepas avaliadas por Morales et al., 2006 também apresentaram tal variação (53 a 190bp). E, por fim, na ISR 3 nove amostras apresentarem 164bp, uma amostra 163bp e 2 amostras 64pb. Tais dados são preliminares, uma vez que tal ISR não vem sendo utilizada como uma região discriminatória para os sorotipos de *Salmonella*. Analisando os fragmentos de cada ISR e seus respectivos sorotipos, verificou-se uma diferença em cepas de Enteritidis e Typhimurium, onde ocorreu uma deleção de 70bp localizada na ISR 3. Os demais sorotipos não apresentaram uma variação significativa no número de nucleotídeos (Tabela 2).

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 2b).



(b)

		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	41	17	17	17	17	87	41	41	39	26
4	S. Typhimurium (7)				100	100	98	92	92	92	92	92	28	28	23	23	73	91	91	100	44
5	S. Typhimurium (6)					100	98	92	92	92	92	28	28	23	23	73	91	91	100	44	
6	S. Typhimurium (8)						98	92	92	92	92	28	28	23	23	73	91	91	100	44	
7	S. Typhimurium AE006468							92	92	92	92	26	26	23	23	72	91	91	98	44	
8	S. Heidelberg CP005995								100	100	100	100	21	21	20	20	73	99	99	92	45
9	S. Enteritidis (2)									100	100	100	21	21	20	20	98	99	99	92	45
10	S. Enteritidis (3)										100	100	21	21	20	20	98	99	99	92	45
11	S. Enteritidis (1)											100	21	21	20	20	98	99	99	92	45
12	S. Enteritidis AM933172												21	21	20	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																	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																				

(c)

		ISR 3																			
		2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
1	S. Gallinarum AM933173	98	51	99	99	99	99	98	98	98	98	98	100	100	99	99	100	100	99	98	46
2	S. Paratyphi AL513382		51	97	97	97	97	100	98	96	98	98	98	98	99	98	98	98	98	100	45
3	S. Bongori			51	51	51	51	51	52	52	52	52	51	51	51	51	51	51	51	51	35
4	S. Typhimurium (7)				100	100	100	97	98	98	98	98	99	99	99	98	98	99	98	97	45
5	S. Typhimurium (6)					100	100	97	98	98	98	98	99	99	98	98	99	99	98	97	45
6	S. Typhimurium (8)						100	97	98	98	98	98	99	99	98	98	99	99	98	97	45
7	S. Typhimurium AE006468							97	98	98	98	98	99	99	98	98	99	99	98	97	45
8	S. Heidelberg CP005995								98	96	98	98	98	98	99	98	98	98	98	100	45
9	S. Enteritidis (2)									100	100	100	98	98	99	98	98	98	98	98	45
10	S. Enteritidis (3)										100	100	98	98	98	97	98	98	98	96	46
11	S. Enteritidis (1)											100	98	98	99	98	98	98	98	98	45
12	S. Enteritidis AM933172												98	98	99	98	98	98	98	98	45
13	S. Pullorum CP006575													100	99	99	100	100	99	98	46
14	S. Pullorum (5)														99	99	100	100	99	98	46
15	S. Grupo D (11)															99	99	99	99	99	45
16	S. Grupo D (12)																99	99	98	98	45
17	S. Pullorum																	100	99	98	46
18	S. Gallinarum (9)																		99	98	46
19	S. Gallinarum (10)																			98	45
20	S. Newport CP010280																				45
21	S. Choleraesuis AE017220																				

## CONCLUSÕES OU CONSIDERAÇÕES FINAIS

A utilização do método de ribotipagem para a análise da região intergênica mostrou-se eficiente na discriminação de sorotipos de *Salmonella*. Estes são dados preliminares e mais estudos vêm sendo realizados para refinar tais achados.

## REFERÊNCIAS

Darini, C. L. A. et al. Aplicação da ribotipagem na epidemiologia molecular de infecções bacterianas. **Medicina**, Ribeirão Preto, v. 30, p. 73-80, mar. 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**, v. 337, p. 61-72, out. 2012.

Júnior, A. B.; Neto, O. C. F. Salmoneloses In: Júnior, A. B.; Silva, E. M.; Fábio, J. D.; Sesti, L.; Zuanaze, M. A. F. **Doenças das Aves**: 2. ed. Campinas: FACTA, 2009. p. 435-454.

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**, v. 264, p.48-58, set. 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](http://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**, v. 57, p.288-295, mai. 2013.