



## IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE SOROTIPOS DE SALMONELAS AVIÁRIAS

Mônica Roberta Cardoso<sup>1</sup>  
Diéssy Kipper<sup>2</sup>  
Vagner Ricardo Lunge<sup>3,4</sup>  
Nilo Ikuta<sup>3,4</sup>

### Resumo

A salmonelose é um das doenças bacterianas animais mais comuns em todo mundo. Bactérias do gênero *Salmonella* evoluíram como patógenos nos últimos 100 milhões de anos. A patogenicidade de cada cepa de *Salmonella* está associada a um “arsenal” de genes (e consequentemente proteínas) de virulência adquirido em diferentes momentos do processo evolutivo. A identificação de cada sorotipo, essencial para a caracterização do isolado, envolve uma série de antisoros e pode ser demorada. O principal objetivo deste estudo foi realizar a identificação de sorotipos de *Salmonella* presentes em aves pela amplificação e sequenciamento de região variável (operon *rrnH*) e que codifica RNAs ribossomais. As amostras consistiram de 30 isolados de *Salmonella* obtidos a partir de amostras de granjas de aves. Estes isolados foram submetidos à sorotipagem tradicional e também à amplificação de uma região intergênica do operon *rrnH*. Os produtos de amplificação foram purificados, quantificados e seqüenciados. Os resultados obtidos foram comparados com dados de referência de sorotipos de *Salmonella* depositados no banco de dados do GenBank. Em geral, os isolados de mesmo sorotipo (Typhimurium, Enteritidis, Heidelberg, etc.) apresentaram sequências idênticas, iguais às informações de cepas de referência. Os resultados obtidos demonstram a possibilidade de caracterização molecular de sorotipos de *Salmonella* de aves pela análise da região intergênica do operon *rrnH*.

Palavras chave: Salmonelose; avicultura, PCR

### INTRODUÇÃO

A *Salmonella* está entre as principais bactérias envolvidas nos surtos de doença pelo mundo (MOREIRA, 2002). As salmoneloses são as enfermidades provocadas pelas bactérias do gênero *Salmonella* que podem ser divididas em espécies, subespécies e diversos sorotipos (JÚNIOR; NETO, 2009) Os sorotipos podem causar doenças em hospedeiros específicos (Gallinarum e suas biovars Gallinarum e Pullorum em aves; Dublin em bovinos; Typhi e Paratyphi no homem, etc.), enquanto outros infectam uma gama maior de hospedeiros (como Typhimurium, Enteritidis, Heidelberg, etc.). No Brasil, a grande maioria das infecções por

<sup>1</sup> Aluna de Medicina Veterinária - Bolsista PROBIC FAPERGS – monica.roberta\_cardoso@hotmail.com

<sup>2</sup> Laboratório de Diagnóstico Molecular – ULBRA –

<sup>3</sup> Professor do PPGBioSaúde – vagner.lunge@gmail.com

<sup>4</sup> Orientador

*Salmonella* em humanos é de origem alimentar, sendo causada principalmente pelos sorotipos Enteritidis e Typhimurium.

A prevalência e o sorotipo de *Salmonella* podem variar consideravelmente entre localidades, regiões e países. Portanto, a vigilância e identificação destas bactérias em humanos e animais de produção (como as aves e suínos) devem ser realizadas a fim de desenvolver um eficiente controle dos sorotipos patogênicos (OIE, 2012). No Brasil o controle é baseado em programas oficiais que buscam a redução e prevenção contra agentes causadores de importantes doenças nas aves, suínos e no homem (BRASIL,2009).

Os diagnósticos disponíveis para a detecção de *Salmonella* muitas vezes se limitam à determinação da presença ou ausência desta bactéria pelo isolamento 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). As técnicas de biologia molecular têm sido cada vez mais utilizadas no auxílio ao diagnóstico da *Salmonella*. Estas envolvem a amplificação pela reação em cadeia da polimerase (PCR) e a obtenção de resultados de maneira convencional (gel de poliacrilamida ou agarose) ou em tempo real (diretamente no termociclador). O diagnóstico molecular permite a detecção da bactéria diretamente nas amostras clínicas e a identificação específica dos sorotipos associados a patologias aviárias (IKUTA et al., 2009).

A sorotipagem é uma ferramenta epidemiológica importante na caracterização de *Salmonella enterica*, porque ajuda a determinar a prevalência e surgimento de sorotipos patogênicos em diferentes regiões. A falta de informações dos sorotipos que circulam em granjas de aves impede medidas de tratamento e controle eficaz (DORNELES et al. 2010). O objetivo do presente estudo consiste em realizar a identificação de sorotipos de *Salmonella* de origem aviária por técnica de amplificação por PCR seguida de sequenciamento de região do operon *rrnH* (codifica RNAs ribossomais).

## METODOLOGIA

### Amostras

Foram obtidos 30 isolados de *Salmonella* a partir de amostras de granjas de aves (órgãos, propés, vísceras e fezes de aves). Estes isolados foram analisados pela técnica clássica de sorotipagem.

### Extração

A extração de DNA foi realizada pelo método de fervura conforme descrito por Soumet et al. (1994). Brevemente, 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 99,9°C. Depois esta amostra passou por um choque térmico e foi centrifugada a 10000 rpm por 3 minutos. Por fim, o sobrenadante foi utilizado para o ensaio de amplificação.

### Amplificação por PCR e sequenciamento

A confirmação do gênero *Salmonella* foi realizada pela amplificação do gene *invA* por PCR em tempo real no equipamento 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 treshold).

As amostras confirmadas para o gênero *Salmonella* foram submetidas à nested-PCR convencional para amplificação de uma região parcial do operon *rrnH*. Foram utilizados primers adaptados dos descritos na literatura por Morales et al. (2006). O programa de PCR incluiu as seguintes condições: para 1ª amplificação, um ciclo de desnaturação inicial de 10s a 94°C, 30 ciclos de desnaturação por 20s a 94°C, anelamento por 40s a 50°C, extensão por 40s a 72°C e 1 ciclo de extensão final a 72°C por 5min; para segunda amplificação – nested, um ciclo de desnaturação inicial de 10s a 94°C, 20 ciclos de desnaturação por 20s a 94°C, anelamento por 40s a 55°C, extensão por 40s a 72°C e 1 ciclo de extensão final a 72°C por 5min.

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 as amostras foram sequenciadas pelo método de Sanger. As sequências obtidas foram comparadas com

dados 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](http://www.geneious.com)).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A sorotipagem clássica permitiu a detecção dos seguintes sorotipos: 11 Gallinarum (sendo 6 do biovar Gallinarum e 5 do biovar Pullorum), 5 Typhimurium, 4 Enteritidis, 3 Heidelberg e 7 indeterminados. Todas amostras analisadas por PCR em tempo real apresentaram resultado positivo na detecção do gene *invA*, confirmando que eram do gênero *Salmonella*.

Os resultados de sequenciamento do operon *rrnH* demonstrou 11 sequências nucleotídicas diferentes. Em geral, os isolados de mesmo sorotipo (Typhimurium, Enteritidis e Heidelberg) apresentaram sequências idênticas, iguais às respectivas sequências de referência. A única exceção foi o sorotipo Gallinarum que apresentou três sequências diferentes, sendo que todas do biovar Gallinarum apresentaram a mesma sequência (idênticas às referências utilizadas), enquanto as 5 amostras do biovar Pullorum apresentaram duas sequências bastante diferentes entre si. Entre as demais 7 amostras, 6 foram identificadas como 4 sorotipos diferentes com base em comparações com bancos de dados de genes: Agona (1), Javiana (2), Rissen (2), Scharzgrund (1). A última amostra demonstrou uma sequência única, não compatível com dados de outros sorotipos. Os resultados obtidos foram utilizados para a construção de uma árvore filogenética.

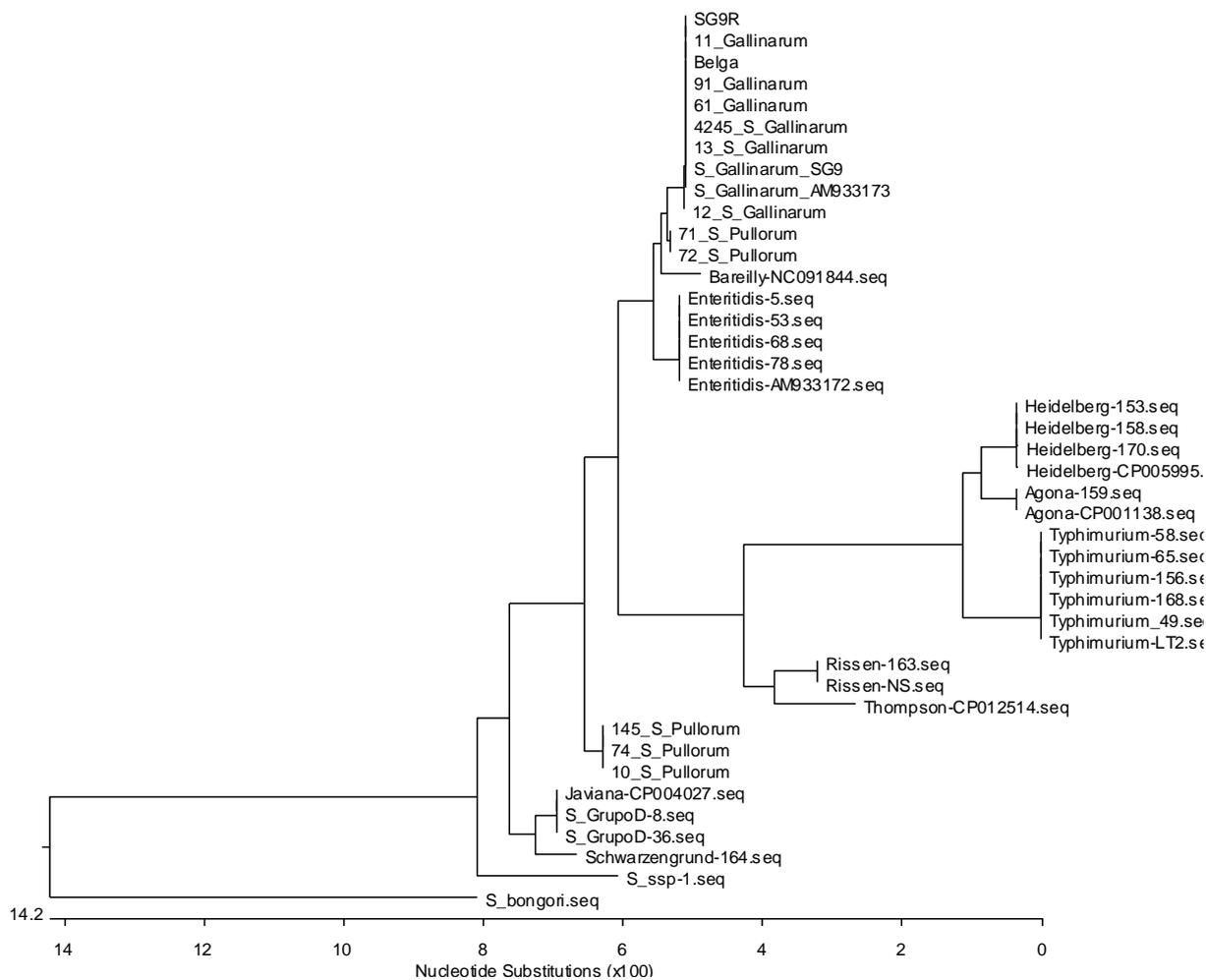


Figura 1 – Árvore filogenética.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados demonstram que é possível realizar a identificação presuntiva de sorotipos de *Salmonella* de origem aviária pela análise da seqüência nucleotídica do operon *rrnH*. Novos estudos estão sendo realizados com um número maior de isolados de *Salmonella* para a confirmação destes achados.

## REFERÊNCIAS

BRASIL, Programas Nacionais de Saúde Animal do Brasil, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), Brasília, DF, 441p, 2009.

DORNELES, C.; CORREA, J.M.; MENDES, S.; HAAS, S.; TIBA, M.L.; CAMPANHER, R., Microbiological analysis of the foods involved in foodborne disease outbreaks occurring in the Rio Grande do Sul State, Brazil. **R Bras Biosci**, v.8, p. 44–48, 2010.

GUARD, J. ET AL., Comparison of dkgB-linked intergenic sequence ribotyping to DNA microarray hybridization for assigning serotype to *Salmonella enterica*.– **Microbiology Letters**, v. 337, p. 61-72, out. 2012.

IKUTA, N.; FONSECA, A.; LUNGE, V. Diagnóstico molecular. In: BERCHIERI, A; SILVA, E.M, DI FÁBIO, J, et al (ed)., **Doenças das aves**. 2ª ed. Campinas: Facta, : 105 -19, 2009

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, 435-454, 2009.

MOREIRA, A. P. O. Pesquisa de Salmonella Spp. em frangos de corte de um dia de idade da região metropolitana de Fortaleza-CE, 2002. Disponível em: <[www.uece.br/ppgcv/dmdocuments/ana\\_moreira.pdf](http://www.uece.br/ppgcv/dmdocuments/ana_moreira.pdf)> Acesso em: 25/05/2016

PULIDO-LANDÍNEZ, M.; SÁNCHEZ-INGUNZA, R.; GUARD, J.; PINHEIRO DO NASCIMENTO, V, Assignment of serotype to Salmonella enteric isolates obtained from poultry and their environment in southern Brazil. **Society for applied microbiology**, 2013.

OIE, Terrestrial Animal Health Code, 2012. Disponível em: <<http://www.oie.int/international-standard-setting/terrestrial-code/access-online/>> Acesso em: 26/05/2016