



CARACTERIZAÇÃO DE SOROTIPOS DE *SALMONELLA* A PARTIR DA ANÁLISE DO *OPERON rrnB*

Rafaella Martins Hellfeldt^{1,2}
Diéssy Kipper²
Fernanda Kieling Moreira Lehmann²
Silvia DeCarli³
Vagner Ricardo Lunge^{4,5}
Nilo Ikuta^{4,5}

RESUMO

Salmonella é um dos principais patógenos bacterianos com a capacidade de causar doenças a partir do consumo de alimentos contaminados de origem animal. A maioria dos registros de surtos de salmonelose em humanos é causado pelos sorotipos patogênicos Enteritidis e Typhimurium. O presente estudo objetivou amplificar as duas regiões espaçadoras intergênicas (ISR1 e ISR2) presentes no *operon rrnB* para discriminar sorotipos das amostras. Foram utilizadas 42 amostras provenientes de laboratórios vinculados a granjas comerciais do Brasil. Os isolados foram confirmados para o gênero *Salmonella* através da amplificação do gene *invA* apresentando um Ct médio de 22,6, variando de 14,7 a 33,2. A região espaçadora intergênica (ISR) de interesse foi amplificada por PCR (*polymerase chain reaction*) convencional utilizando *primers* específicos e seus produtos foram submetidos à detecção por eletroforese em gel de poliacrilamida corado com nitrato de prata. Vinte e cinco amostras amplificaram para as regiões de interesse, apresentando os sorotipos Enteritidis (n=7), Gallinarum (n=3), Agona (n=1), Schwarzengrund (n=1), Rissen (n=1) Heidelberg (n=3), Grupo B (n=1), Grupo D (n=1), Mbandaka (n=1), Pullorum (n=1), spp. (n=3) e Typhimurium (n=2), onde foi possível observar que estes sorotipos apresentaram um padrão de amplificação (bandeamento) distintos entre si.

Palavras chave: Região espaçadora intergênica; PCR; Padrão de amplificação;

INTRODUÇÃO

A *Salmonella* é uma bactéria causadora de doenças humanas e de aves, muitas das quais transmitidas pela alimentação (HUGHES et al. 2003, GREIG et al. 2009, DE OLIVEIRA et al. 2010). Diferentes tipos de salmoneloses podem ocorrer tanto nas aves em produção (lotes de frangos para consumo, galinhas poedeiras, etc.) como nos consumidores de alimentos contaminados por esta bactéria. O Brasil é o segundo maior produtor e principal exportador de carne de frango do mundo (ABPA, 2016), portanto possui uma preocupação enorme em relação à ocorrência deste patógeno tanto nas aves de produção como nos produtos para consumo humano. Existe inclusive um programa oficial do governo brasileiro (Programa

1 Aluno do curso de Medicina Veterinária – Bolsista PIBIT/CNPq – rafinhamartinsh@hotmail.com

2 Laboratório de Diagnóstico Molecular - ULBRA

3 PPG em Ciências Veterinárias - UFRGS

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

5 Professor Orientador - ikuta.ulbra@gmail.com

Nacional de Sanidade Avícola - PNSA) que tem o controle das salmoneloses como uma de suas principais metas (BRASIL, 1994).

Taxonomicamente, o gênero *Salmonella* pertence à família Enterobacteriaceae, sendo uma bactéria gram-negativa em forma de bacilo, não esporulada e não encapsulada. Existem apenas duas espécies, *S. enterica* e *S. bongori*, sendo que a primeira é subdividida em seis subespécies: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica* (CDC, 2011). Os isolados de *Salmonella* são também classificados em sorotipos, sendo que já foram demonstradas mais de 2.600 combinações antigênicas no mundo, a maioria (60%) pertencente à subespécie *enterica* (GRIMONT; WEILL, 2007; ISSENHUTH-JEANJEAN et al., 2014).

O genoma das salmonelas é constituído de uma dupla fita de DNA circular (cromossomal) com aproximadamente 4,6 Mbp, com ocorrência eventual de plasmídeos. Entre os diversos *operons* presentes no DNA cromossomal de *Salmonella*, sete são responsáveis pela produção de RNAs ribossomais e transportadores: *rrnA*, *rrnB*, *rrnC*, *rrnD*, *rrnE*, *rrnG* e *rrnH* (LIU; SANDERSON et al., 1998). As regiões intergênicas nestes *operons* apresentam elevado grau de variação, possibilitando a identificação de gêneros e espécies bacterianos (CHENOLL et al., 2003). Especificamente a região espaçadora intergênica (ISR), localizada entre os genes rRNA 16S e 23S de *Salmonella*, apresenta variações ainda mais sutis e que caracterizam determinados sorotipos de *Salmonella* (MORALES et al., 2006).

A identificação de sorotipos é essencial tanto na detecção de doenças humanas e aviárias, como na compreensão da epidemiologia desta bactéria. Alguns sorotipos de *Salmonella* são associados a doenças específicas (como Gallinarum em aves, Typhi e Paratyphi no homem), enquanto outros sorotipos não estão restritos a nenhuma destas espécies hospedeiras particulares e possuem uma disseminação mais complexa (Enteritidis, Typhimurium, Heidelberg, entre outros). A introdução destes últimos nos lotes de produção de aves pode resultar na contaminação de ovos ou da carcaça das aves no momento do abate (BARROW et al., 1994; UZZAU et al., 2000).

Trabalhos prévios, como o de Pulido-Landínez (2014), demonstram que procedimentos de PCR e sequenciamento estão obtendo resultados positivos para a detecção de sorotipos de *Salmonella* através da análise do *operon rrnH*. No entanto, outros *operons* também poderiam possibilitar a análise de sorotipos e ainda não foram estudados. Com base no potencial informativo das ISRs, o presente estudo tem como objetivo verificar a capacidade de diferenciação de sorotipos de *Salmonella* através da análise destas regiões presentes no *operon rrnB*.

METODOLOGIA

Foram utilizadas 42 amostras de isolados de *Salmonella* pertencentes aos sorotipos Enteritidis (n=12), Gallinarum (n=7), Agona (n=1), Schwarzengrund (n=1), Rissen (n=1) e Heidelberg (n=3), Subgrupo B (n=2), Subgrupo D (n=2), Mbandaka (n=1), Pullorum (n=4), spp. (n=5) e Typhimurium (n=3) provenientes de laboratórios vinculados a granjas comerciais do Brasil.

Foi realizado um estudo *in silico* onde as sequências dos sete *operons* de uma cepa *Salmonella* sorotipo Enteritidis (AM933172) foram extraídas e comparadas com as sequências dos sete *operons* de outros sorotipos, como Typhimurium (AE006468), onde verificamos que apenas os *operons rrnH* e *rrnB* possuíam a mesma estrutura em todos os sorotipos de *Salmonella*. Após foram desenhados e utilizados os *primers* externos ITRB - F1 (5' CGACGTTGATAGGCCGGGT 3') e ITRB - R1 (5' AATTACGCCGGCACCGTGA 3') e *primers* internos ITRB - FN2 (5' GATGCGTTGAGCTAACCGGT 3') e ITRB - RN2 (5' AACAACTACTGAGCGCCTGG 3') que se anelaram a regiões conservadas dos genes 23S e UDP-N acetylenolpyruvilyglucosamine reductase.

Os isolados foram inicialmente confirmados para o gênero *Salmonella*, as amostras foram submetidas a PCR em tempo real para a amplificação do gene *invA* (*StepOne Plus – Applied Biosystems*, Carlsbad CA, EUA) sob 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 (HOORFAR et al., 2000). A avaliação foi realizada através da análise de curvas de amplificação e determinação dos respectivos valores de Ct (*cycle threshold*). Amostras positivas para o gênero *Salmonella* foram amplificadas por PCR convencional (*Veriti 96Well Thermal Cycler – Applied Biosystems*) para amplificação da região intergênica do operon *rrnB*. Desta forma foram realizadas duas reações de PCR, a primeira utilizando *primers* externos seguindo as condições de: 1 ciclo de desnaturação a 94°C por 10s, 30 ciclos 94°C por 20s, 60°C por 40s, 72°C por 40s e 1 ciclo 72°C por 5min. Posteriormente, o produto da amplificação foi submetido a um Nested PCR com *primers* internos sob as condições de 1 ciclo de desnaturação a 94°C por 10s, 20 ciclos 94°C por 20s, 60°C por 40s, 72°C por 40s e 1 ciclo a 72°C por 5min. O programa de PCR ajustado foi descrito pela autora Pulido-Landínez e seus colaboradores (2013). Por fim, o produto da Nested PCR foi submetido à detecção por eletroforese em gel de poliacrilamida corado com nitrato de prata, para avaliação do padrão de bandas de cada sorotipo de *Salmonella*, sendo esperado na primeira amplificação um fragmento aproximado de 759 bp e em Nested um fragmento aproximado de 639 bp.

As amostras serão purificadas através do método de sílica utilizando o *Kit NewGene Preamp* (Simbios Biotecnologia, Cachoeirinha RS, Brasil) e quantificadas por eletroforese em gel de agarose para então serem sequenciadas pelo método de Sanger na empresa Ludwig Biotec (Porto Alegre, Brasil), utilizando os mesmos pares de *primers* das reações de Nested PCR..

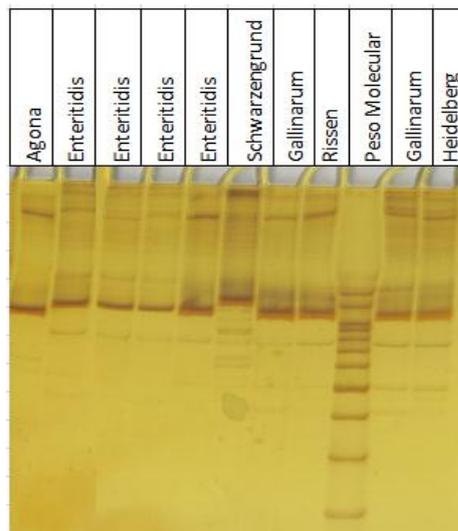
RESULTADOS E DISCUSSÃO

As 42 amostras de *Salmonella* foram positivas para o gene *invA*, o que era esperado pois todas as amostras utilizadas foram previamente sorotipadas, apresentando um Ct médio de 22,6, variando de 14,7 a 33,2.

As amostras foram submetidas à detecção da região do operon *rrnB* através da eletroforese em gel de poliacrilamida. Destas amostras, 25 (59,52%) apresentaram padrão de amplificação (bandeamento) de diferentes tamanhos para cada sorotipo amplificado, Enteritidis (n=7), Gallinarum (n=3), Agona (n=1), Schwarzengrund (n=1), Rissen (n=1) Heidelberg (n=3), Grupo B (n=1), Grupo D (n=1), Mbandaka (n=1), Pullorum (n=1), spp. (n=3) e Typhimurium (n=2). As outras 17 (40,48%) amostras não amplificaram as regiões espaçadoras intergênicas do operon *rrnB*.

As amostras dos sorotipos analisados apresentaram uma variação de 500 bp a 750 bp, demonstrando que cada sorotipo possui um padrão de amplificação distinto das regiões espaçadoras intergênicas presentes no operon *rrnB*, sendo esta variabilidade utilizada para futura caracterização dos sorotipos (Figura 1). Isto corrobora com os estudos implementados por Morales et al. (2006), Guard et al. (2012), Pulido-Landínez et al. (2014) e Kipper (2016) os quais analisaram o operon *rrnH* e observaram que os diferentes sorotipos apresentavam padrões de bandeamentos distintos.

Figura 1: Imagem obtida de um gel de poliacrilamida mostrando as bandas correspondentes a produtos de PCR com diferentes padrões de comprimento (500 bp a 750 bp) de alguns dos sorotipos de *Salmonella* amplificados. Além disso, o marcador de Peso Molecular utilizado foi de 50 bp.



Fonte: Autores

As amostras dos sorotipos Agona, Mbandaka, Typhimurium, Grupo B e spp. apresentaram um tamanho aproximado de 500 bp. A amostra do Grupo D apresentou aproximadamente 600 bp. E, as pertencentes aos sorotipos Enteritidis, Schwarzengrund, Gallinarum, Rissen, Heidelberg e Pullorum apresentaram aproximadamente 750 bp.

Com o sequenciamento destas amostras, poderíamos obter as informações exatas sobre os pares de bases, para podermos analisar variantes dentro de um biovar, suas deleções e inserções, organizando estas amostras em clados para avaliar a evolução e, para que possamos comparar as sequências geradas com as sequências de referência. As amostras estão sendo preparadas para serem purificadas e encaminhadas para sequenciamento a nível de nucleotídeos para a verificação exata de pares de base.

CONCLUSÕES OU CONSIDERAÇÕES FINAIS

A utilização da análise da região espaçadora intergênica (ISR) se mostrou eficiente na diferenciação de sorotipos de *Salmonella*, sendo esta uma técnica em ascensão na área da biologia molecular e que deve ser estudada mais a fundo e implementada em novos projetos.

REFERÊNCIAS

ABPA. **Relatório Anual 2016**. Disponível em: http://abpabr.com.br/storage/files/versao_final_para_envio_digital_1925a_final_abpa_relatorio_anual_2016_portugues_web1.pdf. Acesso em: 20 mai. 2017, 15:32:10

BARROW, PA; HUGGINS, MB; LOVELL, MA. Host specificity of *Salmonella* infection in chickens and mice is expressed in vivo primarily at the level of the reticuloendothelial system. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 10, p. 4602-4610, out. 1994.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria Ministerial nº 193 de 19 de setembro de 1994. **Programa Nacional de Sanidade Avícola**. In: Diário da República Federativa do Brasil. Brasília, 1994.

CDC. **National Salmonella Surveillance Overview**. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services, CDC, 2011. Disponível em: https://www.cdc.gov/nationalsurveillance/pdfs/nationalsalmsurveilloverview_508.pdf. Acesso em: 20 mai. 2017, 15:40:20

CHENOLL, E.; MACIAN, M. C.; AZNAR, R. Identification of Carnobacterium, Lactobacillus, Leuconostoc and Pediococcus by rDNA-based techniques. **Systematic and applied microbiology**, v. 26, n. 4, p. 546-556, 2003.

DE OLIVEIRA, Fernanda Arboite et al. Characterization of Salmonella Enteritidis isolated from human samples. **Food Research International**, v. 45, n. 2, p. 1000-1003, 2012.

GREIG, J. D.; RAVEL, A. Analysis of foodborne outbreak data reported internationally for source attribution. **International journal of food microbiology**, v. 130, n. 2, p. 77-87, 2009.

GRIMONT, P. A. D.; WEILL, F.X. Antigenic formulae of the Salmonella serovars. **WHO collaborating centre for reference and research on Salmonella**, v. 9, 2007.

GUARD, J.; SANCHEZ-INGUNZA, R.; MORALES, C. 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.

HOORFAR, J.; AHRENS, P.; RÅDSTRÖM, P. Automated 5' nuclease PCR assay for identification of Salmonella enterica. **Journal of clinical microbiology**, v. 38, n. 9, p. 3429-3435, 2000.

HUGHES, C.; GILLESPIE, I.A.; O'BRIEN, S.J. et al. Foodborne transmission of infectious intestinal disease in England and Wales, 1992–2003. **Food Control**, v. 18, n. 7, p. 766-772, 2007.

ISSENHUTH-JEANJEAN, S.; ROGGENTIN, P.; MIKOLEIT, M. 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.

KIPPER, D. **Caracterização molecular de surtos de Salmonella isolados de aves de produção, alimento e humanos no Brasil**. 2016. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde) – Universidade Luterana do Brasil, Canoas, 2016.

LIU, SL; SANDERSON, K.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.

MORALES, C. A.; GAST, R.; GUARD-BOULDIN, J. 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.

PULIDO - LANDÍNEZ, M.; SÁNCHEZ-INGUNZA, R.; GUARD, J. et al. Assignment of serotype to Salmonella enterica isolates obtained from poultry and their environment in southern Brazil. **Letters in applied microbiology**, v. 57, n. 4, p. 288-294, 2013.

PULIDO-LANDÍNEZ, M.; WASHINGTON, P.; THOMTON, J.K. 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, 2014.

UZZAU, S.; BROWN, D.J.; WALLIS, T. et al. Host adapted serotypes of Salmonella enterica. **Epidemiology and infection**, v. 125, n. 02, p. 229-255, 2000.