



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

Rafaella Martins Hellfeldt<sup>1</sup>, Diéssy Kipper<sup>2</sup>, Fernanda Kieling Moreira<sup>2</sup>, Silvia DeCarli<sup>3</sup>,  
Vagner Ricardo Lunge<sup>4,5</sup>, Nilo Ikuta<sup>4,5</sup>

1 Aluna 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 Orientador

### INTRODUÇÃO

A *Salmonella* é uma bactéria causadora de doenças humanas e de aves, muitas das quais transmitidas pela alimentação. O Brasil é o segundo maior produtor e principal exportador de carne de frango do mundo, portanto possui uma preocupação enorme em relação à ocorrência deste patógeno tanto nas aves em produção como nos produtos para consumo humano. Existe inclusive um programa oficial do governo brasileiro (Programa Nacional de Sanidade Avícola - PNSA) que tem o controle das salmoneloses como uma de suas principais metas.

Taxonomicamente, o gênero *Salmonella* pertence à família Enterobacteriaceae, sendo uma bactéria gram-negativa em forma de bacilo. Existem apenas duas espécies, *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori*, sendo que a primeira é subdividida em seis subespécies: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica*. 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*. As denominações dos sorotipos e as respectivas fórmulas antigênicas estão listadas no esquema *Kauffmann-White-Le Minor* (KWL).

O genoma das salmonelas é constituído de uma dupla fita de DNA circular (cromossomal) com aproximadamente 4,6 Mbp. 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*. As regiões intergênicas nestes operons apresentam elevado grau de variação, possibilitando a identificação de gêneros e espécies bacterianos. 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*. Trabalhos prévios 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.

### OBJETIVO

O presente estudo tem como objetivo verificar a capacidade de diferenciação de sorotipos de *Salmonella* através da análise das duas regiões espaçadoras intergênicas presentes no operon *rrnB*.

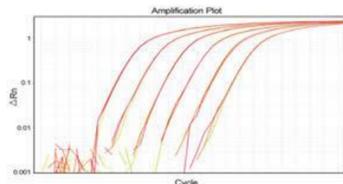
### MATERIAIS E MÉTODOS

Amplificação do gene *invA*



PCR Tempo Real (RT-PCR)

Análise dos Cts (*cycle threshold*)

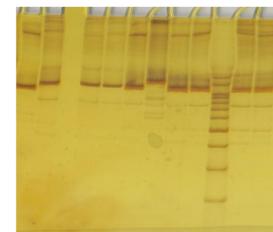


Amplificação das ISRs



PCR Convencional

Análise dos resultados



Eletroforese em gel de poliácridamida corado com nitrato de prata

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

As 42 amostras de *Salmonella* foram positivas para o gene *invA*, apresentando um Ct médio de 22,6, variando de 14,7 a 33,2. 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), Subgrupo B (n=1), Subgrupo 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, sendo esta variabilidade utilizada para futura caracterização dos sorotipos. 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 apresentam padrões de bandeamentos distintos.

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 de pares de bases para podermos analisar variantes dentro de um biovar, suas deleções e inserções, organizar 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.

### CONCLUSÃO

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

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.

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.

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.; 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.