



## DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS DE ANÁLISE DE DNA PARA IDENTIFICAÇÃO DE SOROTIPOS DE *SALMONELLA*

Rafaella Martins Hellfeldt<sup>1,2</sup>  
Diéssy Kipper<sup>2</sup>  
Fernanda Kieling Moreira Lehmann<sup>2</sup>  
Sílvia De Carli<sup>3</sup>  
Nilo Ikuta<sup>4,5</sup>  
Vagner Ricardo Lunge<sup>4,5</sup>

### Resumo

As salmoneloses são doenças normalmente entéricas causadas pelo consumo de alimentos contaminados por *Salmonella*. Essa bactéria é classificada em mais de 2.600 sorotipos que necessitam ser identificados para fins diagnósticos e epidemiológicos. No entanto, os procedimentos laboratoriais de sorotipagem são trabalhosos e demorados. Esse estudo objetivou estabelecer métodos de análise de DNA para identificar sorotipos de *Salmonella*. Os procedimentos experimentais consistiram de (1) revisão em bancos de dados bibliográficos e genéticos para definir regiões alvo potenciais para identificação específica dos sorotipos de *Salmonella*; (2) desenvolvimento de métodos de amplificação pela reação em cadeia da polimerase (PCR) seguida de sequenciamento de DNA; (3) validação desses métodos pela análise de 63 isolados de *Salmonella* de 21 sorotipos de ocorrência frequente em granjas de produção animal e alimentos do Sul do Brasil. Os resultados mostraram a identificação de duas regiões espaçadoras intergênicas (ISRs, *intergenic spacers regions*) localizadas nos operons *rrnH* e *rrnB* (síntese de RNAs transportadores/ribossomais). Os métodos de PCR-sequenciamento possibilitaram a amplificação e análise das ISRs de todos os 63 isolados. Amostras de mesmo sorotipo apresentaram sequências específicas em ambos ISRs, possibilitando a identificação dos sorotipos. A análise comparativa demonstrou 95,2% de concordância do método de análise de DNA em relação à sorotipagem. A análise conjunta das sequências aumentou o poder de discriminação, possibilitando inclusive a diferenciação de isolados de mesmo sorotipo (Typhimurium e Gallinarum). Em conclusão, esses resultados demonstram a eficiência dos métodos de PCR-sequenciamento das ISRs dos operons *rrnH* e *rrnB* na identificação de sorotipos de *Salmonella*.

Palavras chave: PCR; *Salmonella*; RNAs ribossomais.

### INTRODUÇÃO

A *Salmonella* é uma bactéria causadora de doenças humanas e de animais, muitas das quais transmitidas pela alimentação (DE OLIVEIRA et al. 2010). As salmoneloses podem

---

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

2 Laboratório de Diagnóstico Molecular - ULBRA

3 PPG em Ciências Veterinárias - UFRGS

4 Professor do PPGBioSaúde

5 Professor Orientador – vagner.lunge@gmail.com

ocorrer tanto nos animais em produção (aves, suínos, bovinos) como nos consumidores de alimentos contaminados com esta bactéria.

O gênero *Salmonella* pertence à família Enterobacteriaceae, sendo uma bactéria gram-negativa em forma de bacilo. Os isolados de *Salmonella* são usualmente classificados em sorotipos, sendo que já foram demonstradas mais de 2.600 combinações antigênicas no mundo (ISSENHUTH-JEANJEAN et al., 2014). A identificação de sorotipos é essencial tanto no diagnóstico de doenças humanas e animais, como para a compreensão da epidemiologia de um surto e/ou disseminação dessa bactéria em uma determinada região geográfica.

O genoma das salmonelas é constituído de uma dupla fita de DNA circular com aproximadamente 4,6 milhões de pares de bases, com ocorrência eventual de um ou mais plasmídeos. Entre os diversos agrupamentos de genes (*operons*) presentes no genoma, sete são responsáveis pela síntese de RNAs ribossomais e transportadores: *rrnA*, *rrnB*, *rrnC*, *rrnD*, *rrnE*, *rrnG* e *rrnH* (LIU; SANDERSON et al., 1998). As regiões intergênicas destes *operons* apresentam elevado grau de variação, possibilitando a identificação de gêneros e espécies bacterianos (CHENOLL et al., 2003). Especificamente a região espaçadora intergênica (ISR, *intergenic spacer region*), localizada entre os genes rRNA 16S e 23S, apresenta variações ainda mais sutis e que caracterizam determinados sorotipos de *Salmonella* (MORALES et al., 2006). Estudos prévios inclusive demonstraram que procedimentos de PCR e sequenciamento da ISR do *operon rrnH* permitem identificar sorotipos de *Salmonella* (MORALES et al., 2006; PULIDO-LANDINEZ et al., 2014).

O presente estudo teve como objetivo estabelecer métodos de análise de DNA para identificar sorotipos de *Salmonella*. Esses métodos tiveram como alvo as ISRs de dois *operons* de síntese de RNAs ribossomais e transportadores (*rrnB* e *rrnH*).

## **METODOLOGIA**

A metodologia consistiu em:

1) Revisão em bancos de dados bibliográficos e genéticos para definir regiões alvo potenciais para identificação específica dos sorotipos de *Salmonella*.

2) Realização de estudo *in silico* com as sequências dos operons de RNAs ribossomais/transportadores de cinco sorotipos principais (Enteritidis, Typhimurium, Heidelberg, Gallinarum, Infantis).

3) Desenho e síntese dos *primers* para amplificação das regiões selecionadas.

4) Estabelecimento dos procedimentos de PCR-sequenciamento: amplificação por PCR convencional (*Veriti 96Well Thermal Cycler – Applied Biosystems*); visualização dos produtos de amplificação por eletroforese em gel de poliacrilamida corado com nitrato de prata; purificação do fragmento pelo método de sílica utilizando o *Kit NewGene Preamp* (Simbios Biotecnologia, Cachoeirinha RS, Brasil); quantificação por eletroforese em gel de agarose; sequenciamento pelo método de Sanger na empresa Ludwig Biotec (Porto Alegre, Brasil).

5) Análise das sequências: avaliação inicial pela ferramenta BLASTn, da plataforma GenBank; alinhamento com sequências de referência; montagem das árvores filogenéticas.

6) Validação dos procedimentos com a análise de 63 isolados de *Salmonella* pertencentes aos sorotipos Agona (n=1), Anatum (n=2), Banana (n=1), Bareilly (n=1), Coeln (n=1), Enteritidis (n=9), Gafsa (n=1), Gallinarum (n=12), Give (n=1), Hadar (n=1), Heidelberg (n=5), Infantis (n=3), Livingstone (n=1), Mbandaka (n=1), Panama (n=1), Rissen (n=1), Schwarzengrund (n=2), Tennessee (n=1), Typhimurium (n=12), O:6,7 (n=1), além de cinco amostras com sorotipo indeterminado.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os *primers* foram selecionados a partir do alinhamento da região alvo do operon *rrnH* de cinco cepas de *Salmonella* Enteritidis (AM933172), Gallinarum (AM933173), Typhimurium (AE006468), Heidelberg (CP016565) e Infantis (CP016406) utilizando o *software* MegAlign (Lasergene 6.0). A partir deste alinhamento, foram selecionados dois *primers*, um localizado no final do gene conservado 23S e o outro localizado no início do gene *dkgB*, garantindo que apenas o operon *rrnH* fosse amplificado. Esta análise também foi realizada para os demais *operons* (A, B, C, D, E, G), sendo possível observar que apenas o operon *rrnB* possuía a mesma estrutura em todos os sorotipos de *Salmonella* incluídos no alinhamento. Assim novos *primers* foram desenhados para amplificação do operon *rrnB*.

As 63 amostras de *Salmonella* foram submetidas à amplificação e detecção das regiões dos *operons* *rrnB* e *rrnH* por eletroforese em gel de poliacrilamida. As amostras analisadas apresentaram uma variação de 534 a 873 bp (*rrnB*) e 601 a 870 bp (*rrnH*), demonstrando que cada sorotipo possui um padrão de amplificação distinto das regiões espaçadoras intergênicas presentes nos *operons*, sendo esta variabilidade utilizada para futura caracterização dos sorotipos, corroborando com os estudos implementados por Morales et al. (2006), Guard et al. (2012), Pulido-Landínez et al. (2014) e Kipper (2016)

Com relação a análise do *operon rrnH*, na pesquisa realizada no BLASTn, 60 (95,2%) das 63 amostras retornaram sequências de mesmo sorotipo caracterizado pelo método KWL, 56 delas apresentaram 100% de similaridade com cepas de referência de seus devidos sorotipos. Dois isolados Gallinarum retornaram cepas do biovar Pullorum com 98% de similaridade, um isolado de Anatum retornou uma cepa com 96% de similaridade ao seu sorotipo, e um isolado de sorotipagem incompleta pelo método KWL retornou com 99% de identidade uma cepa Minnesota. As três amostras que o sequenciamento discordou do método KWL pertenciam aos sorotipos Schwarzengrund, Typhimurium e O:6,7, as quais retornaram na pesquisa do BLASTn como Bredeney (100%), Heidelberg (100%) e Choleraesuis (100%), respectivamente.

Já para o *operon rrnB*, na pesquisa realizada no BLASTn, novamente 60 (95,2%) das 63 amostras retornaram o mesmo sorotipo do método KWL, 52 delas apresentaram 100% de similaridade com cepas de referência do sorotipo esperado. Três isolados de Typhimurium, um de Heidelberg, um de Gallinarum biovar Pullorum e um de Panama retornaram com 98% de similaridade cepas de referência de mesmo sorotipo, já um isolado de Anatum apresentou 92% de similaridade e um de Enteritidis 99%. Das três amostras que discordaram, uma pertencia ao sorotipo Infantis, uma Typhimurium e uma O:6,7, que retornaram com 100% de similaridade com Koessen, Heidelberg e Choleraesuis, respectivamente.

A avaliação combinada foi realizada a partir da junção das sequências de nucleotídeos do *operon rrnH* seguida pela sequência do *operon rrnB* (*rrnH\_B*). O tamanho da sequência variou de 1006 a 1692 bp. Foram realizadas três árvores filogenéticas, uma para cada *operon* e uma com a análise conjunta, onde, em geral, os isolados se agruparam com suas cepas de referência formando clados distintos. A análise conjunta das sequências aumentou o poder de discriminação, possibilitando inclusive a diferenciação de isolados de mesmo sorotipo para Typhimurium e Gallinarum. A variabilidade do grupo de cepas do sorotipo Gallinarum permitiu a discriminação de cepas do biovar Gallinarum, biovar Pullorum e ainda um subgrupo variantes de cepas de Pullorum.

## CONCLUSÕES

A análise conjunta das regiões espaçadoras intergênicas (ISRs) dos *operons rrnB* e *rrnH* pelo método de PCR-sequenciamento se mostrou eficiente na identificação de sorotipos de *Salmonella*, além da diferenciação de isolados dentro de um mesmo sorotipo, 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

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.

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.

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.; 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.