

# UTILIZAÇÃO DE CULTURAS PADRÕES DE *Salmonella* PARA DIAGNÓSTICO MOLECULAR

Andiara Gonçalves<sup>1</sup>  
Gabriela Sartori Felkl<sup>2</sup>  
Juliana Vitória Messias Bittencourt<sup>3</sup>

GONÇALVES, A.; FELKL, G. S.; BITTENCOURT, J. V. M. Utilização de culturas padrões de *Salmonella* para diagnóstico molecular. *Arq. Ciênc. Saúde UNIPAR*, Umuarama, v. 17, n. 1, p. 15-18, jan./abr. 2013.

**RESUMO:** Diagnóstico quanto à presença de microrganismos patogênicos nos alimentos é indispensável para garantir a qualidade e a segurança alimentar. Registros epidemiológicos oficiais apontam a *Salmonella* sp. como um dos principais microrganismos causadores de doenças de origem alimentar no estado do Paraná. Portanto, vale ressaltar a importância da verificação de presença/ausência deste patógeno nos alimentos. As técnicas microbiológicas convencionais possuem custo e tempo de execução elevado. Em contrapartida, o diagnóstico molecular é inovador, de alta sensibilidade e especificidade, tendo como principal vantagem a redução do tempo da análise. O presente trabalho tem como objetivo realizar diagnóstico molecular por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para sorotipo de salmonela, com sua cultura padrão. Para tanto, cepas de *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella gallinaru*, e *Salmonella enteritidis* foram repicadas em caldo nutriente, incubadas a 37°C e após 24 horas realizou-se a extração de DNA utilizando o método de fenol/clorofórmio, seguida da sua amplificação, a qual foi satisfatória para a detecção do gene *InvA*, observou-se que a temperatura de hibridização ideal foi de 57°C. A realização desta metodologia é favorável por poder ser realizada de forma rápida e específica.

**PALAVRAS-CHAVE:** Diagnóstico molecular; *Salmonella*; DNA.

## USE OF STANDARD *Salmonella* CULTURES FOR MOLECULAR DIAGNOSIS

**ABSTRACT:** Diagnosis regarding the presence of pathogenic microorganisms in food is essential to ensure its quality and safety. Official epidemiological records define *Salmonella* sp. as one of the main microorganisms responsible for foodborne illnesses in the state of Paraná. Therefore, it is worth highlighting the importance of checking for the presence/absence of this pathogen in food. Conventional microbiological techniques are costly and time-consuming. On the other hand, molecular diagnosis is innovative, with a high sensitivity and specificity, as well as decreasing the analysis time, which is the main advantage of this approach. The present work aims to perform molecular diagnosis using Polymerase Chain Reaction (PCR) for *Salmonella* serotype with its standard culture. In order to do this, strains of *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella gallinaru* and *Salmonella enteritidis* were replicated in nutrient broth and incubated at 37°C. After 24 hours, DNA was extracted using phenol/chloroform method, followed by its amplification, which was satisfactory for the detection of the *InvA* gene, with 57°C being the optimal hybridization temperature. This methodology showed positive outcome since it can obtain fast and specific results.

**KEYWORDS:** Molecular diagnosis; *Salmonella*; DNA.

## Introdução

Atualmente a necessidade de se diagnosticar a presença de microrganismos patogênicos nos alimentos é indispensável para aumentar a qualidade e a garantia da segurança alimentar (ABREU, 2007; JIN, YIN, YE, 2009). As doenças transmitidas por alimentos (DTA's) têm grande variabilidade genética do organismo que lhe da origem, portanto é de suma importância a comparação de resultados com cepas padrões.

A alta incidência de DTA's ocorre devido a características como: controle inadequado de temperatura; manipulação incorreta dos alimentos; contaminação cruzada de alimentos crus ou processados (PIETROWSKI; RANTHUM, 2009). Os alimentos mais envolvidos em DTA's são frequentemente os de origem animal, sendo que as carnes ocupam o segundo lugar (OMS, 2002). Isto ocorre pois muitos agentes patogênicos são pertencentes à microbiota dos animais, em alguns casos estes ainda são transportado no ambiente de produção, via utensílios, manipulador, equipamento ou ainda pela água (SAMULAK et al., 2011).

Registros epidemiológicos oficiais apontam a *Salmonella* sp. como um dos principais microrganismos causadores de doenças bacterianas de origem alimentar no Paraná. Portanto, vale ressaltar a importância da verificação da pre-

sença deste nos alimentos (AMSON; HARACEMIV; MASON, 2006).

A *Salmonella*, pertencente à família *Enterobacteriaceae*, é um dos gêneros mais envolvidos nos surtos de toxinfecção alimentar, por apresentar-se de diversas formas na natureza e possuir um elevado número de reservatórios. São bacilos Gram-negativos não produtores de esporos, anaeróbios facultativos, produtores de gás a partir da glicose, além de serem capazes de utilizar citrato como única fonte de carbono. A maioria é móvel, através de flagelos peritríquios. Comporta-se como patógeno intracelular facultativo, possui como *habitat* o trato intestinal de homens e animais. Por possuir capacidade de invasão celular, é associada sempre a problemas entéricos, septicêmicos e abortivos. A doença causada por este microrganismo é a salmonelose (MOREIRA, 2002; FRANCO; LANDGRAF, 2002; BORSOI, 2009; ANDRADE et al., 2010).

De acordo com a Resolução - RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001, o resultado da determinação de *Salmonella* sp., deve ser expresso como Presença ou Ausência na alíquota analisada e, para tanto, tem-se necessidade da realização de análises microbiológicas (BRASIL, 2012).

As técnicas microbiológicas convencionais fazem uso de meios de culturas. Desta forma, testes bioquímicos

<sup>1</sup>Acadêmica do Programa de Pós graduação em Zootecnia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná; email: andiara.goncalves@gmail.com

<sup>2</sup>Mestre em Engenharia de Produção pela Universidade Tecnológica Federal do Paraná; email: gabifelsartori@hotmail.com

<sup>3</sup>Doutora em Genética Molecular, docente das coordenações de Engenharia Química, Tecnologia em Alimento e ao programa de pós-graduação em Engenharia de Produção da Universidade Tecnológica Federal do Paraná; email: julianavitória@utfpr.edu.br

tornam-se necessários para confirmar a presença do microrganismo cultivado. Estes testes podem apresentar variações de acordo com fatores ambientais e sobre a expressão gênica. Além disso, há um grande risco de interpretações errôneas. No entanto, quando se faz o uso de uma diversidade de testes o custo final da análise, bem como seu tempo de execução, se torna elevado (GANDRA et al., 2008).

Com o desenvolvimento da biologia molecular, observa-se a possibilidade de sua aplicação para determinação e caracterização de microrganismos patogênicos nos alimentos de forma inovadora, com alta sensibilidade e especificidade, tendo como principal vantagem a redução do tempo da análise (CASTELANI; DUARTE, 2011).

Um diagnóstico comumente utilizado na biologia molecular é a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), pois seu tempo de execução e sua alta especificidade são considerados satisfatórios quando comparado a outras metodologias. Esta é realizada em três etapas: desnaturação, anelamento e extensão. Tais etapas são realizadas em ciclos, sendo repetidos em média 35 vezes. Cada etapa deste ciclo é executada em uma temperatura ideal (MAGISTRADO, GARCIA, RAYMUNDO, 2001; CORDEIRO, 2003; VIANEZ, 2007; GANDRA et al., 2008).

A análise do microrganismo é possível pois utiliza-se um padrão que possui descendentes de uma cultura pura, que contém apenas uma espécie de organismo que se origina de uma mesma célula parental (PELCZAR et al., 1997).

Portanto, o objetivo deste trabalho foi realizar o diagnóstico molecular através da PCR para sorotipos de *Salmonella* com uma cultura padrão.

## Material e Método

As espécies de cepas de *Salmonella* utilizadas foram doadas pela Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) em março de 2011, sendo: ATCC 12011 – *Salmonella choleraesuis*; ATCC 9184 – *Salmonella gallinaru*; ATCC 13076 – *Salmonella enteritidis*. As cepas foram repicadas em Caldo Nutriente e incubadas por 24 horas (para recuperação das células injuriadas) e, em seguida foram mantidas no Caldo Nutriente sob refrigeração e repicadas periodicamente.

## Extração de DNA

Para a extração do DNA das cepas de *Salmonellas* utilizou-se padrões adaptados de Moreira et al. (2010). O protocolo apresenta os seguintes passos: Transferência de 1,5ml da cultura para os tubos de micro tubo os quais foram submetidos a centrifugação por 1 minuto a 12.000rpm. Em seguida descartou-se o líquido sobrenadante e adicionou-se 600µl de tampão *Sodium dodecyl sulfate* (SDS) 1% e 5µl de Proteinase K. Posteriormente incubou-se os micro tubo em banho-seco 65°C por 30 minutos. Após a incubação adicionou-se 700µl de CIA (24:1 de clorofórmio e álcool isoamílico) e centrifugou-se a 13.000rpm por 7 minutos. O sobrenadante foi transferido para novo micro tubo onde adicionou-se 200µl de tampão de extração (SDS 1%) e 650µl de CIA. Realizou uma nova centrifugação a 13.000rpm por 7 minutos, transferindo o sobrenadante para novo micro tubo. Neste foi adicionado 650µl de CIA e novamente centrifugado a 13.000rpm por 7 minutos, em seguida o sobrenadante foi

transferido para novo micro tubo, no qual adicionou-se 1mL de etanol 96% e centrifugou-se a 13.000rpm por 3 minutos. Após a centrifugação o álcool foi retirado e o micro tubo seco em temperatura ambiente, o pellet então foi ressuspenso em 50µl de água deionizada estéril.

## Amplificação do DNA

A PCR foi realizada baseada em Maldonado (2008), o qual amplifica o gene *InvA* de 457 pares de bases, que é específico para o gênero de *Salmonella*.

**Tabela 1:** Sequência de iniciadores (Adaptado de Maldonado (2008))

Gene	Primer	Sequência
<i>InvA</i>	Sal <i>sense</i>	5'- TGC CTA CAA GCA TGA AAT GG-3'
	Sal <i>anti-sense</i>	5'- AAA CTG GAC CAC GGT GAC AA- 3'

As amostras de DNAs isoladas foram amplificadas em um volume final da reação de 25 µl, sendo 22 µl da reação preparada (mix) e 3 µl de DNA.

**Tabela 2:** Reagentes para PCR

Componentes	Concentração	1 amostra
Água	-	15,15 µl
dNTP's	0,2 mM	0,8 µl
Buffer	1x	2,5 µl
Primer (Sense+Anti sense)	1µM de cada	2,5 µl
MgCl2	0,75 mM	0,75 µl
Taq	1,5 U	0,3 µl
DNA	≈ 20 ng	3 µl
Total		25µl

Para determinação de um padrão de identificação de *Salmonella* sp. tornou-se necessário efetuar diferentes ajustes na técnica de acordo com os equipamentos disponíveis, bem como os ciclos de temperaturas utilizadas para anelamento dos *primers*. A temperatura ideal de hibridização determinada foi de 57°C. As amostras foram amplificadas no Termociclador Therm-1000/ Maxygene Versão nº1.4, os ciclos adotados podem ser verificados na Tabela 3.

**Tabela 3:** Ciclos de temperatura para PCR

	Temperatura	Tempo
<b>1º Ciclo</b>	93°C	5min
<b>2º Ciclo</b>	Desnaturação	93°C 1min
	Anelamento	57°C 30seg
	Extensão	72°C 1min
<b>3ºCiclo</b>	72°C	5min

## Visualização dos resultados

Para observar os resultados das ampliações utili-

zou-se o sistema de eletroforese de agarose (1,5%) em cuba horizontal com tampão de corrida TBE (Tampão Tris-Borato-EDTA). Após o gel ser submetido por uma corrente elétrica de 80 V por 30 minutos. O gel foi corado com brometo de etídio a 0,5µg/mL durante 15 minutos. Para visualização das bandas foi realizada a exposição do gel em transiluminador ultravioleta. As bandas foram comparadas com um padrão de 100 pares de base.

## Resultados e Discussões

Em relação ao método de extração de DNA total, alguns autores (ALVAREZ et al. 2004; KUMAR et al. 2006; HALATSI et al. 2006) realizaram-na utilizando o método de extração por fervura. Contudo, neste trabalho optou-se pelo método de fenol/clorofórmio com o objetivo de minimizar possíveis reações inespecíficas ou até mesmo a não reação, conforme discutido por Sambrook e Russel (2006). A metodologia de extração após sofrer algumas modificações para a adaptação aos equipamentos do laboratório mostrou-se satisfatória além de apresentar reprodutibilidade.

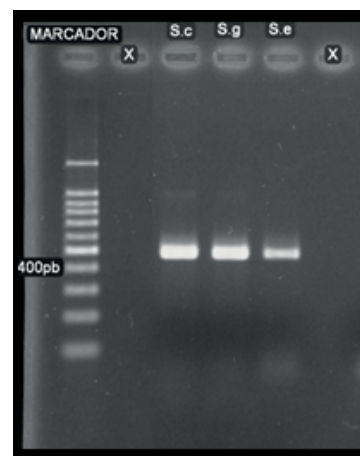
Para a detecção do gene *InvA*, observamos que a programação apresentou sucesso após a determinação da temperatura de hibridização via PCR- gradiente.

A temperatura ideal de hibridização determinada foi de 57°C, a qual divergiu-se quando comparada com resultados encontrados por Passo (2009). Embora a temperatura utilizada neste trabalho seja diferente daquela usada pelo autor citado, as reações de PCR ocorreram com sucesso.

Na amplificação das amostras observou-se que a localização da banda se encontra entre 400 e 500 pares de bases, o qual se pode considerar correto uma vez que o primer do gene *InvA* amplifica um fragmento de 457pb, como pode-se visualizar na Figura 1.

Em estudos realizados acerca da presença de *Salmonella* sp. em produtos frescos suínos, foram encontradas cerca de 2% de alimentos contaminados no estado do Paraná (REIS; KRUGER; MACIEL, 1995). A presença da *Salmonella* sp., em alimentos é causadora de salmoneloses e diversas doenças como febre tifóide, bacteremia, gastroenterite e infecções focais (MALDONADO, 2008).

Em pesquisa realizada por Felix (2012), com 171 amostras de linguiças apenas duas apresentaram contaminação por *Salmonella* sp., no entanto ressalta que a ausência deste microrganismo não significa a ausência de outros microrganismos patógenos.



**Figura 1:** Foto da amplificação das amostras

M: Marcador de peso molecular; x- controle negativo (água deionizada estéril); Sc- *Salmonella choleraesuis* (ATCC 12011); Sg- *Salmonella gallinaru* (ATCC 9184); Se- *Salmonella enteritidis* (ATCC 13076).

## Conclusão

Com esse resultado, pode-se concluir que a metodologia de extração e amplificação de DNA de *Salmonella* sp. em cultura padrão, empregando uma temperatura de anelamento de 57°C foi efetiva e satisfatória.

O emprego deste método em alimentos processados poderá determinar a sensibilidade da técnica para detecção da presença de *Salmonellas*. A importância disso mostra-se no controle de qualidade microbiana que está sendo cada vez mais aplicado em toda a cadeia de produção alimentar, de forma a minimizar o risco de doenças transmitidas por alimentos.

Dada à importância que as doenças transmitidas por alimentos (DTA's) assumem no contexto de saúde pública, este trabalho apresentou uma alternativa de diagnóstico de patógenos. A sua confiabilidade e seu tempo de execução tornam possível sua utilização conjuntamente com a microbiologia tradicional. Metodologias inovadoras em diagnósticos de patógenos são de grande interesse, pois a detecção de microrganismo, de forma rápida e específica é de extrema importância. No entanto, para implementação da técnicas de análise mostrada faz-se necessário à padronização de protocolos e a validação dos mesmos em diversas matrizes de alimentos, todo este processo demanda tempo e custos.

## Referências

ABREU, A. de. **Esforço para inovação tecnológica: uma caracterização da indústria de alimentos município de Marília/SP.** 2007. 189 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia da Produção) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2007.

AMSON, G.V.; HARACEMIV, S. M. C.; MASSON, M. L. Levantamento de dados epidemiológicos relativos à ocorrência/surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA's) no estado do Paraná-Brasil, no período de 1978 a 2000. *Ciênc. Agrotec. Lavras*, v. 30, n. 6, p.1139-1145, nov./dez. 2006.

- ANDRADE, R. B. et al. Métodos diagnósticos para os patógenos alimentares: *Campylobacter sp.*, *Salmonella sp.* e *Listeria monocytogenes*. Arq. Inst. Biol. São Paulo, v. 77, n. 4, p.741-750, out./dez. 2010.
- ALVAREZ, J. et al. Development of a multiplex PCR technique for detection and epidemiological typing of *Salmonella* in human clinical samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 4, p. 1734-1738, 2004.
- BORSOI, A. Inoculação *Salmonella heidelberg* e *Salmonella enteritidis* em pintos de corte para a avaliação da morfometria cecal, invasibilidade, persistência de excreção fecal e o uso de ácido orgânico e óleo essenciais no controle de *Salmonella enteritidis*. 2009. 107 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Org.). Resolução - RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12\\_01rdc.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_01rdc.htm)>. Acesso em: 11 mar. 2012.
- CASTELANI, L.; DUARTE, K. M. R. Métodos moleculares em microbiologia de alimentos. **PUBVET**, Londrina, v. 5, n. 2, ed. 149, art. 1000, 2011.
- CORDEIRO, M. C. R. **Engenharia genética**: Conceitos básicos, ferramentas e aplicações. EMBRAPA, Doc. 86, 2003. p. 23-24.
- FELIX, A. S. et al. **Investigação da presença de salmonella spp. Em linguças tipo frescal, mista e caseira, vendidas a granel comercializadas no município de Governador Valadares**. Disponível em: <<http://www.pergamum.univale.br/pergamum/tcc/Investigacaodapresencadesalmonellasspemlinguicastipofrescalmistaecaseiravendidasagranelcomercializadasnomunicipiodegovernadorvaladares.pdf>>. Acesso em: 06 dez 2012.
- FRANCO, B. D.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2002.
- GANDRA, E. A. et al. Técnicas moleculares aplicadas à microbiologia de alimentos. Acta Sci. Technol. Maringá, v. 30, n. 1, p.109-118, 2008.
- HALATSI, K. et al. PCR detection of *Salmonella* spp. using primers targeting the quorum sensing gene *sdiA*. **FEMS Microbiology**, v. 259, p. 201-207, 2006.
- JIN, S. Q.; YIN, B. C.; YE, B. C. Multiplexed bead-based mesofluidic system for detection of food-borne pathogenic bacterium. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 21, p. 6647-6654, nov. 2009.
- KUMAR, S. et al. Detection of *Salmonella enterica* serovar Typhi (S. Typhi) by selective amplification on *invA*, *viaB*, *fliC-d* and *prt* genes by polymerase chain reaction in multiplex format. **Letters in Applied Microbiology**, v. 42, n. 2, p. 149-154, 2006.
- MAGISTRADO, P. A.; GARCIA, M. M.; RAYMUNDO, A. K. Isolation and polymerase chain reaction-based detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from poultry in the Philippines. **International Journal Of Food Microbiology**, v. 70, p. 197-206, out. 2001.
- MALDONADO, A. G. **Ocorrência de *Salmonella* spp. em amostras de carcaças e miúdos de frango obtidas em uma feira e um mercado municipal na zona oeste da cidade de São Paulo: análise crítica entre a técnica convencional em meios de cultivo e reação em cadeia pela polimerase - PCR**. 2008. Dissertação (Medicina Veterinária) - Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.
- MOREIRA, A. P. O. Pesquisa de *Salmonella sp.* em frangos de corte de um dia de idade da Região Metropolitana de Fortaleza-CE. 2002. 56 f. Dissertação (Mestrado em Ciências veterinárias) - Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2002.
- MOREIRA, M. et al. Methodological variations in the isolation of genomic from *Streptococcus bacterium*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, n. 4, p. 845-849, 2010.
- OMS. Organização Mundial da Saúde. **Emerging food borne disease**. Fact Sheet, n.124, revised January 2002. Disponível em: <<http://www.who.int/inffs/in/fact124.html>>. Acesso em: 04 dez. 2012.
- PASSO, M. C. S. U. C. **Desenvolvimento de métodos moleculares para avaliação da qualidade e segurança microbiológica em produtos alimentares**. 2009. 50 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada) - Universidade de Lisboa, Lisboa, 2009.
- PELCZAR, M. J. JUNIOR. et al. **Microbiologia conceitos e aplicações**. 2. ed. Dad: Makron Books, 1997.
- PIETROWSKI, G. A. M.; RANTHUM, M. Apostila de microbiologia aplicada: aulas teóricas e práticas, 2009.
- SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. The condensed protocols from molecular cloning: a laboratory manual. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, 2006.
- SAMULAK, R. L. et al. **Condição higiênico-sanitária de abatedouro frigorífico e fábrica de embutidos no estado do Paraná**. Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial. Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). v. 05, p. 408-417, 2011.
- VIANEZ JUNIOR, J. L. S. G. **Bioinformática aplicada no desenho de indicadores para genes funcionais**: Degradação de herbicida 2,4-D - estudo de caso. 2007. 148 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.