

Isolamento e identificação molecular de *Salmonella* spp

Isolation and molecular identification of *Salmonella* spp

RESUMO

Evelyn Mirian Ferreira da Luz
ferreiradaluz1@hotmail.com
Universidade Tecnológica Federal
do Paraná, Ponta Grossa, Paraná,
Brasil.

Nome Completo do Orientador
Elisabete Hiromi Hashimoto
Universidade Tecnológica Federal
do Paraná, Ponta Grossa, Paraná,
Brasil

O Brasil se destaca como um grande produtor e exportador de carne de frango. No entanto, devido as várias etapas do processamento a carne de frango é susceptível à contaminação por microrganismos patogênicos. Estudos vem sendo realizados para identificar as espécies e os sorotipos de *Salmonella* spp. prevalentes em carne de frango. O trabalho teve como objetivo isolar e identificar os sorotipos de *Salmonella* spp. presente em amostras coletadas em plantas de abatedouro de frango. Com a técnica de isolamento convencional foi possível observar que entre as 22 amostras, 16 apresentaram colônias indicadoras de *Salmonella*. Outra forma de identificar os sorotipos é por meio da identificação molecular por PCR, o qual foi iniciado com a extração de DNA dos isolados, mas ainda se encontra em andamento.

PALAVRAS-CHAVE: *Salmonella*. Identificação. Contaminação.

Recebido: 19 ago. 2019.

Aprovado: 01 out. 2019.

Direito autoral: Este trabalho está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.



ABSTRACT

Brazil stands out as a major producer and exporter of chicken meat. However, due to the various processing steps chicken meat is susceptible to contamination by pathogenic microorganisms. Studies have been conducted to identify *Salmonella* spp. Species and serotypes. prevalent in chicken meat. The objective of this work was to isolate and identify *Salmonella* spp. present in samples collected from chicken slaughtering plants. With the conventional isolation technique, it was possible to observe that among the 22 samples, 16 presented *Salmonella* indicator colonies. Another way to identify serotypes is by PCR molecular identification, which started with DNA extraction from the isolates but is still in progress.

KEYWORDS: *Salmonella*. identification. Contamination.

INTRODUÇÃO

O gênero *Salmonella* pertence à família *Enterobacteriaceae*, são anaeróbias ou aeróbia facultativas, Gram-negativas, oxidase-negativas, não-esporogênicas, são mesófilas, com temperatura ótima de crescimento entre 35 e 37°C. (FORSHELL & WIERUP, 2006 apud MEDEIROS, 2013, p.17).

O gênero *Salmonella* consiste em duas espécies, *S. enterica* e *S. bongori*. *Salmonella enterica* é dividida em seis subespécies: *S. enterica*, *S. salamae*, *S. arizonae*, *S. diarizonae*, *S. houtenae* e *S. indica*. E apresenta mais de 2000 sorovares. (GRIMONT & WEILL, 2007 apud MEDEIROS, 2013, p.17).

A salmonelose aviária é uma das doenças bacterianas que mais causam impacto na avicultura mundial. A carcaça do frango, os ovos e seus derivados são considerados a maior fonte de infecção desse patógeno para o homem (CARDOSO & TESSARI, 2008).

As bactérias estão no trato intestinal das aves e a carne pode ser contaminada facilmente em plantas de processamento caso o abate seja inadequado.

Dentre os 2500 sorotipos descritos de *Salmonella*, a *S. pullorum* (SP), *S. gallinarum* (SG), agentes causadores da pulrose e do tifo aviário, respectivamente, a *S. typhimurium* (ST) e *S. enteritidis* (SE), agentes causadores do paratifo aviário são os principais agentes de importância da avicultura (CARRASCO et al, 2010, p. 2).

Para realizar a detecção de *Salmonella* em amostras de alimentos pode-se optar por duas técnicas, a técnica do isolamento convencional, que é uma técnica confiável e eficiente, porém requer muitos dias para obter-se resultado, pois baseia-se em diversas etapas, tais como, enriquecimento, pré-enriquecimento, enriquecimento seletivo. Com a necessidade de uma técnica mais rápida, baseou-se em técnicas moleculares, dentre essas, destaca-se a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), descrita por Medeiros (2013), por ser metodologia rápida, específica e sensível.

O trabalho teve como objetivo identificar cepas de *Salmonella* spp. isoladas de abatedouro de frango, a fim de se avaliar e fornecer informações a respeito da predominância de sorovares.

METODOLOGIA

Cepas Padrões

Para realização de todos os experimentos do trabalho foram utilizados três cepas de *Salmonella* spp. padrões, sendo elas: *Salmonella* Typhimurium, *S. Enteritidis* e *S. Heidelberg*. No banco da ATCC (American Type Culture Collection),

essas cepas são encontradas com identificação de 14028, 13076 e 8326, respectivamente.

Isolados para identificação

As cepas a serem identificadas consistiram em um total de 33 linhagens isoladas a partir de carcaças de frango, no período de junho a setembro de 2014 no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do frigorífico objeto do estudo, o qual se localiza no oeste do estado de Santa Catarina.

Reativação das Cepas

As 33 linhagens que haviam sido isoladas anteriormente encontravam-se conservadas há mais de 2 anos em pequenos tubos de ensaio com ágar BHI (*Brain heart infusion*). Para reativação dessas linhagens, utilizou-se tubos de ensaio com caldo BHI, após o inóculo, os tubos foram incubados a temperatura de 37 °C por 24-48h, fornecendo local nutritivo afim de intensificar seu crescimento.

Meio seletivo para *Salmonella*

Os isolados foram submetidas as quatro etapas sucessivas necessárias para a detecção de *Salmonella spp.* Etapas essas que consistiram em (pré-enriquecimento, enriquecimento seletivo, plaqueamento e confirmação bioquímica). No entanto, devido ao longo tempo de armazenagem e riscos de contaminação as cepas foram reativadas e inoculadas em meio seletivo conhecido como Agar SS (*Agar Salmonella Shigella*).

Extração De DNA Para PCR

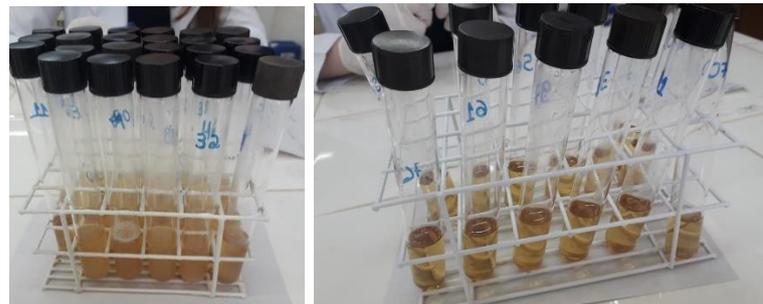
A realização da extração de DNA foi baseada em um protocolo retirado do livro **Ferramentas de Biologia Molecular (Bittencourt; Benetti, 2016)**. Para fazer a extração de DNA os isolados foram reinoculados em caldo BHI, e incubados a 37 °C por 24-48h. O primeiro passo realizado para a extração foi a utilização do vortex para a homogeneização dos tubos de ensaio com cultura em meio líquido, após a homogeneização transferiu-se 1,5 ml de cultura para tubos de eppendorf, e efetuou-se a centrifugação por 1 minuto a 12000rpm. Após a centrifugação descartou-se o líquido sobrenadante, e adicionou-se 600µL tampão SDS 1%. Agitou-se a solução em vortex e foi adicionado 5µL de Proteinase K (inversão) seguido pelo incubamento em banho-seco a 65°C por 30 minutos e foi aguardado o resfriamento. Após o resfriamento foi adicionado 700µL de clorofórmio álcool isoamílico (24:1) (CIA) realizou-se a agitação em vortex durante 5 minutos e foi efetuado a centrifugação a 13000rpm durante 7 minutos. Após a centrifugação foi descartado o líquido sobrenadante e transferiu-se para um novo eppendorf (±500µL) e foi adicionado 200 µL de tampão de extração (SDS 1%) e 650µL de CIA. Novamente foi realizado a agitação em vortex da solução durante 5 minutos e a centrifugação a 1300rpm durante 7 minutos. Foi retirado o líquido sobrenadante após a centrifugação e realizou-se a transferência para novo eppendorf (±500µL),

seguinte da adição de 650 μ L de CIA, agita-se em vortex durante 5 minutos e segue para a centrifugação a 13000rpm durante 7 minutos. Por fim, retirou-se o líquido sobrenadante após a centrifugação e transferiu-se a cultura para um novo eppendorf onde foi adicionado 1mL de etanol 96%. A solução foi homogeneizada por inversão ($\pm 20x$) e levada para a centrífuga a 13000 rpm durante 3 minutos. Em seguida, o álcool foi retirado e realizou-se a secagem em temperatura ambiente durante aproximadamente 15 minutos, após a secagem suspendeu-se o pellet em 100 μ L de TE (H_2O + TRIS + EDTA) e a amostra foi armazenada no freezer.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Quando realizado a reativação das amostras em caldo BHI, algumas das amostras apresentaram dificuldade no crescimento, depois de alguns tentativas cresceram, embora outras mesmo depois de várias tentativas não cresceram, como mostra as figuras 1 e 2.

Figura 1 e 2: Crescimento de *Salmonella* em caldo BHI (esquerda) e ausência de crescimento (direita).



Fonte: Autoria própria (2019).

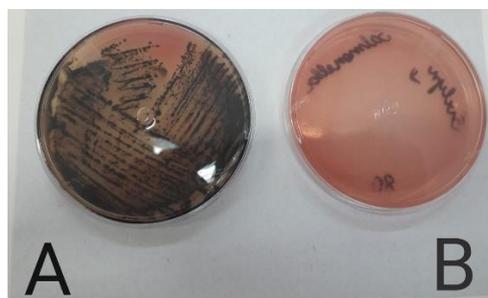
Devido a um problema de equipamento do laboratório ocorreu a perda do material inicial de trabalho, sendo assim precisou-se reativar algumas amostras e realizar o isolamento de colônias presentes nas amostras. Para a reativação das 33 amostras foi gasto em torno de 4 meses de trabalho, pois algumas amostras apresentaram dificuldades no seu crescimento, houve casos de algumas contaminações nas amostras, tais como fungos, leveduras e até mesmo mais de uma bactéria.

Crescimento em ágar SS

Ao realizar o experimento para identificação de *Salmonella* com o meio seletivo Agar SS (Agar *Salmonella Shigella*), foi possível observar que houve crescimento de colônias negras em apenas algumas amostras, o que indica a presença de *Salmonella*.

A figura 3 apresenta a diferenciação de placas com e sem crescimento de *Salmonella* sp. no meio Agar SS.

Figura 3: Meio Agar *Salmonella Shigella* indicando a ausência/presença de *Salmonella*. Placa (A) com crescimento de *Salmonella* – Placa (B) sem crescimento de *Salmonella*.



Fonte: Autoria própria (2019).

Com base em características descritas na literatura (GOMES et al., 2010), o Ágar SS é um meio seletivo baseado no grau de inibição dos microrganismos gram-positivos e outras Enterobacteriaceae que não a *Salmonella* e a *Shigella*, que este inibe devido ao seu teor de sais biliares, *brilliant green* e citratos.

A diferenciação de organismos entéricos consegue-se através da incorporação de lactose no meio. Os organismos que fermentam a lactose produzem ácido que, na presença do indicador vermelho neutro, resulta na formação de colônias vermelhas. Os organismos não fermentadores da lactose formam colônias incolores. Este último grupo contém a maioria dos elementos patogênicos intestinais, incluindo *Salmonella* e *Shigella*. O tiosulfato de sódio e o citrato férrico permitem a detecção da produção de sulfureto de hidrogênio como se pode verificar pelas colônias com centros pretos. Este meio é utilizado para o isolamento primário de *Salmonella* (INSTRUÇÕES DE UTILIZAÇÃO – MEIOS EM PLACAS PRONTOS A USAR, 2013).

Tabela 1 – Número de isolados reativados em BHI e identificados fenotipicamente em ágar SS

| | Reativação em BHI | Colônias pretas em ágar SS |
|------------------------|-------------------|----------------------------|
| Número de isolados (%) | 22 (66,6%) | 16 (48,5%) |
| N=33 | | |

Fonte: Autoria própria (2019).

Inicialmente os testes foram realizados com 33 amostras, mas dessas 33 amostras apenas 22 foram reativadas totalmente em caldo BHI, sendo assim, o teste com o meio seletivo Agar SS foi realizado com 22 amostras, dessas 22 amostras que foram estriadas em placas com ágar SS, 16 isolados confirmaram colônias características de *Salmonella*.

CONCLUSÕES

Tendo em vista o método de identificação molecular por meio de placas com meio Agar SS, com base na literatura foi possível concluir que ao observar as placas com colônias negras representam cepas com características de *Salmonella* sp. A confirmação da identificação será realizada por identificação molecular por PCR, o qual foi iniciado com a extração de DNA dos isolados, mas ainda se encontra em andamento.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e a Fundação Araucária, pela bolsa de estudos e auxílio financeiro que possibilitou a dedicação integral ao programa de Iniciação Científica, estendo meus agradecimentos a UTFPR – Ponta Grossa.

REFERÊNCIAS

BITTENCOURT, Juliana Vitória Messias; BENETTI, Thalyta Marina. Ferramentas de Biologia Molecular. Ponta Grossa: UTFPR – UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ, 2016. E-book.

CARDOSO A.L.S.P. & TESSARI E.N.C. *Salmonella* na segurança dos alimentos. Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo, v.70, n.1, p.11-13, 2008. Disponível em: http://www.biologico.agricultura.sp.gov.br/uploads/docs/bio/v70_1/cardoso.pdf Acesso em 12 jul. 2019.

CARRASCO, A. O. T., ISSAKOWICZ, J. C., MORAIS, M. T. G. F., FATORETTO, L. A., PANDOLFI, J. R. C., SILVA, L. C., PINTO, A. A. Levantamento Sorológico de *Mycoplasma* spp, *Salmonella* sp e Doença de Newcastle em Pombos Domésticos (*Columba livia*) de Vida Livre. UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde, Londrina, v.13, n.1, p.23-27. 2011.

GOMES, Renato A.R. et al. Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água. 4. ed. [S. l.]: Varela, 2010. 624 p.

INSTRUÇÕES DE UTILIZAÇÃO – MEIOS EM PLACAS PRONTOS A USAR: BD *Salmonella Shigella* Agar. [S. l.: s. n.], 2013. 4 p. Disponível em: <http://legacy.bd.com/resource.aspx?IDX=9082>. Acesso em: 16 jul. 2019.

MEDEIROS, Nadielly Xavier. Detecção Molecular de *Salmonella* sp. em amostras avícolas. 2013. Dissertação (Mestre em Ciência Animal) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2013. Disponível em: <http://repositorio.bc.ufg.br/tede/handle/tede/5217>. Acesso em: 12 jul. 2019.