

Identificação molecular de *Salmonella* spp. pelo método MALDI-TOF

Molecular identification of *Salmonella* spp. by the MALDI-TOF method

RESUMO

Arthur Baldomero Taques
arthurtaques@hotmail.com
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, Paraná, Brasil

Elisabete Hiromi Hashimoto
elisabete@utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, Paraná, Brasil

Herrison Yoshiki Yocida Fontana
herrionfontana@usp.com
Universidade de São Paulo Instituto de Ciências Biomédicas, São Paulo, São Paulo, Brasil

Salmonella spp. pertencem à família Enterobacteriaceae, são bactérias que possuem forma de bastonete e são, Gram-negativas. Seu hábitat primário é o trato intestinal de animais, sendo encontrada também em outras partes do corpo. No Brasil, *Salmonella* spp. possuem uma grande variação de notificações dos surtos de doenças ocorridos por alimentos contaminados, geralmente encontrados em produtos cárneos. Todavia, com crescente consumo de produtos cárneos, e a possibilidade de contaminação, se torna imprescindível que se tenha uma identificação taxonômica precisa. O objetivo desse trabalho foi pesquisar *Salmonella* spp. através de técnica molecular e suas características morfológicas de bactérias isoladas de frigorífico e abatedouro de frango da região Oeste de Santa Catarina. Foram 28 isolados, submetido as análises microbiológicas, extração de DNA plasmidial por eletroforese e submetido ao MALDI-TOF, podendo-se afirmar que foram identificados 28 sorovares de *Salmonella* através dos métodos aplicados, estando de acordo com padrões na literatura.

PALAVRAS-CHAVE: *Salmonella*, identificação molecular, MALDI-TOF

ABSTRACT

Salmonella spp. belong to the Enterobacteriaceae family, are rod-shaped bacteria and are Gram-negative. Its primary habitat is the intestinal tract of animals, and is also found in other parts of the body. In Brazil, *Salmonella* spp. have a wide range of notifications of disease outbreaks caused by contaminated food, usually found in meat products. However, with increasing consumption of meat products, and the possibility of contamination, it is essential to have an accurate taxonomic identification. The objective of this work was to research *Salmonella* spp. through molecular technique and its morphological characteristics of bacteria isolated from a slaughterhouse and chicken slaughterhouse in the western region of Santa Catarina. 28 isolates were submitted to microbiological analysis, plasmid DNA extraction by electrophoresis and submitted to MALDI-TOF, it can be said that 28 *Salmonella* serovars were identified through the applied methods, in accordance with standards in the literature.

KEYWORDS: *Salmonella*, molecular identification, MALDI-TOF.

Recebido: 19 ago. 2020.

Aprovado: 01 out. 2020.

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



A



INTRODUÇÃO

Salmonella spp. pertencem à família Enterobacteriaceae, são bactérias que possuem forma de bastonetes, Gram-negativas, e um dos principais patógenos envolvidos em casos de doenças transmitidas por alimentos. Predominantemente encontrada no trato intestinal de animais. Os alimentos mais comumente contaminados por *Salmonella* spp., são principalmente a carne bovina, e de aves, ovos, leite e vegetais contaminados com fezes animais (DAMER, 2014).

No Brasil, *Salmonella* spp. possuem uma grande variação de notificações dos surtos de doenças ocorridos por alimentos contaminados, geralmente encontrados em produtos cárneos (BRASIL, 2015). Nos últimos anos, o número de surtos causados por *Salmonella* spp. vem aumentando consideravelmente, tanto em países em desenvolvimento como nos desenvolvidos. *Salmonella* sp. é um dos patógenos mais frequentemente associados a doenças de origem alimentar (VAN AMSON, 2006);

Todavia, com crescente consumo de produtos cárneos, e a possibilidade de contaminação, se torna imprescindível que tenha uma identificação taxonômica precisa. Canada (2017), cita a importância de técnicas moleculares, para gerar uma possível identificação onde baseia-se na comparação das sequências de ácidos nucleicos (DNA, RNA) ou perfis de proteínas de um microrganismo com dados documentados de organismos conhecidos. Algumas das técnicas são eletroforese em gel, amplificação do material genético, reação em cadeia da polimerase. Nas técnicas baseadas em sequenciamento, é determinada um trecho específico de DNA, onde esta sequência é comparada normalmente em algoritmos computacionais.

O objetivo desse trabalho foi pesquisar *Salmonella* spp. através de técnica molecular e suas características morfológicas de bactérias isoladas de frigorífico e abatedouro de frango da região Oeste de Santa Catarina.

MATERIAL E MÉTODOS

Esse trabalho foi realizado em etapas no período de 14 de agosto a 05 de dezembro/2019. A etapa da coleta do material, foi utilizado o método de pré-resfriamento denominados chiller, onde a temperatura da água nos tanques de imersão deve ser de até 16 °C e 4 °C pós lavagens e evisceração. A próxima etapa foi realizada nos laboratórios da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Câmpus Ponta Grossa, para a realização da ativação das amostras, inoculação, crescimento e extração de DNA. A última etapa foi realizada em conjunto com o Laboratório de Resistência Bacteriana e Alternativas Terapêuticas, Instituto de Ciências Biomédicas ICB II, Universidade de São Paulo, onde realizou as análises das sequências gênicas.

REATIVAÇÃO E MANUTENÇÃO DAS AMOSTRAS

Um total de 28 isolados foram reativadas através de um pré-enriquecimento em caldo não seletivo para restaurar células injuriadas a uma condição fisiológica estável. Para isso as amostras foram desenvolvidas em formato de triplicata, em micro tubos de centrifugação da marca Eppendorf, com tamanho de 1,5 mL, onde

foi retirado 0,5 m L da amostra e inoculado 1m L de caldo de infusão cérebro e coração (BHI - Sigma - Aldrich). Após o procedimento as amostras foram incubadas em uma estufa B.O.D a 37 °C por cerca de 52 horas. Após sua reativação, foi realizado um inóculo em placas de Petri, contendo cerca de 20 m L de meio de cultura Ágar Salmonella- Shigella (SS - IONLAB), transferindo com alça de platina um pequeno volume do inóculo para o ágar, e realizou-se a técnica de inóculo em superfície de estria por esgotamento (MICHAEL et al. 2000). As placas foram incubadas na B.O.D a 37 °C, aproximadamente 48 horas, até o crescimento de colônias isoladas.

ISOLAMENTO DE DNA E EXTRAÇÃO DE DNA

As análises seguiram para extrair o DNA genômica das *Salmonella* spp. utilizando um protocolo adaptado de Moreira et al. (2002), sendo ele: utilizando o meio BHI, formulação conforme o indicado pelo fabricante em um tubo de centrifugação adicional 5mL de meio para 200µL da cultura.

O conteúdo nos tubos foi homogeneizado em vortex; e 1,5 mL de inóculo foram centrifugados por 1 min a 12.000 rpm. Após o descarte do sobrenadante volume de 600 µL tampão SDS 1% foi adicionado ao pellet que foi resuspenso por agitação em vortex. Em seguida, adicionou-se 5 µL de Proteinase K (Inversão); incubou-se em banho-seco a 65 °C por 30 minutos; aguardou o resfriamento. Após o período, adicionou-se 700 µL de clorofórmio álcool isoamílico (24:1) (CIA), realizou-se a agitação em vortex por 5 minutos; seguida de centrifugação a 13.000 rpm por 7 min. O sobrenadante foi retirado e transferido para novo eppendorf (±500 µL); ao qual foi adicionado 200 µL de tampão de extração (SDS 1%) e 650 µL de CIA. Após a homogeneização em vortex por 5 minutos, centrifugou-se à 13.000 rpm por 7 min; retirou-se o sobrenadante e transferiu o sobrenadante para novo eppendorf (±500 µL); adicionou-se 650 µL de CIA; agitou-se em vortex por 5 minutos; centrifugou-se 13000 rpm por 7 minutos; retirou-se o sobrenadante e transferiu para novo eppendorf (± 500 µL); adicionou-se 1mL de etanol de 96%; homogeneizou por inversão (±20 x); centrifugou a 13000 rpm por 3 min; retirou o álcool e deixou secar (temp. amb. ± 15 min; ressuspendeu o pellet em TE (H₂O + TRIS + EDTA) 100 µL.

Obtido o DNA, foi realizado o procedimento de eletroforese em gel de agarose para amplificar e analisar a sua qualidade além de possibilitar a visualização da quantidade de pares de bases. Isso foi possível através da revelação do gel através da imersão por brometo de Etídeo e exposição da luz UV por um transiluminador.

Sobre os processos, foi utilizado os protocolos adaptados de Bittercourt et.al (2016), para a elaboração do gel de agarose, utilizou-se: 30 mL de TBE e 0,42 g de agarose, aquecendo e depositando na cuba acrílica com o pente para gerar poços para possibilitar o depósito do DNA; com o gel pronto foi realizada a mistura de 3 µL DNA com 3µL de peso molecular da marca Ludwing – 100 pb; submetido a eletroforese por cerca de 40 minutos a 70 volts; após o processo o gel foi retirado da cuba acrílica e imerso em brometo de etídio cerca de 15 min; e manuseando cuidadosamente o gel para ser depositado no transiluminador para possibilitar a análise através da incidência de luz UV e assim verificar o DNA amplificado.

O método *Matrix Associated Laser Desorption-Ionization – Time of Flight* (MALDI-TOF), é um processo, onde depositado o material biológico em uma placa

que possui uma matriz polimérica, sendo irradiada com um laser que vaporiza a amostra e há ionização de várias moléculas, que por sua vez são aspiradas num tubo de vácuo e levadas a um detector: conforme a molécula, o tempo de chegada ao detector (time of flight) é diferente, assim gerando um gráfico com diversos picos para cada espécie bacteriana ou fúngica. Obtendo esse gráfico, o sistema possui um banco de dados onde após gerar essa pontuação consegue determinar o diagnóstico do microrganismo analisado. Casos de microrganismo não classificados, a plataforma sugere criar um próprio banco de dados, onde microrganismos pouco representados, sejam enviados à empresa *Bruker Daltonics* para a atualização do software, que ocorre a cada quatro meses.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

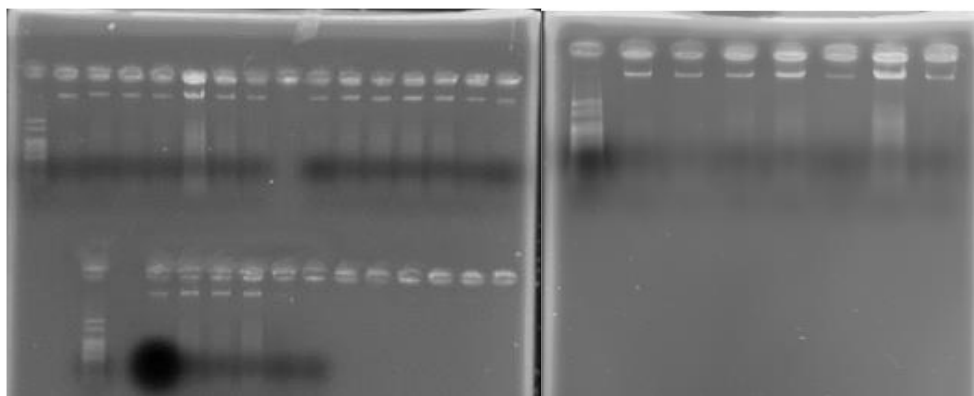
Neste trabalho foram analisados 28 isolados. Todos isolados passaram por uma reativação por meio BHI, obtendo características turvas amareladas com tons de preto, onde segundo Bennett (1998), as amostras ganhavam um aspecto turvo, com tons de amarelo ou preto podendo ocorrer a incidência ou não de pellet no fundo ou no corpo do tubo. Assim afirmando que houve a reativação e criação de colônias das amostras. Como o experimento foi realizado em triplicata se obteve 84 tubos de Eppendorf, para aumentar a eficiência dos procedimentos a seguir.

Em relação ao seu crescimento e isolamento de colônias, foi decidido usar o meio Agar SS para cultivo. Como dito por McCain & Powell (1990), o ágar SS, quando, se tratado de isolamento positivo de *Salmonellas* spp., possui uma eficiência de 97,0% quando relacionados com os demais meios de cultura. Ao utilizar o meio ágar SS em etapas de enriquecimento de cultura consegue-se impedir a presença e proliferação de microrganismo indesejados.

As culturas obtidas através da semeadura seguiram as características perceptíveis do estudo realizado por Embrapa (2016), que a utilização do ágar SS inibe o crescimento de microrganismos Gram positivos, o meio ganha coloração avermelhada ou tons amarelados e as colônias presentes, apresentam a coloração bege com o centro negro ácido sulfídrico (H₂S) podendo assim constituir que existe o desenvolvimento de *Salmonellas* spp.. Assim todas as placas dos isolados ganharam características de meio esbranquiçado e suas colônias beges com o centro negro.

Após a etapa de crescimento das colônias, foi utilizado o protocolo adaptado por Moreira et al. (2002) para realizar a extração do DNA nos 28 isolados. Assim obtendo-se o gel de agarose com os respectivos DNA representados na Figura 1.

Figura 1- Gel de agarose, submetido a banho de brometo de etídio, fotografado por transiluminador.



Fonte: Autoria própria. (2019)

A Figura 2 apresentam em sua primeira canaleta o peso molecular Leader – Ludwig – 100bp, e nas demais se encontram as amostras de *Salmonellas* spp. Conseguindo visualizar aproximadamente 100bp encontradas na extração. O DNA pode ser caracterizado de boa qualidade segundo Costa (2001) quando sua banda está bem definida, onde não possui incidência de outras bandas na mesma coluna e podendo conter pequeno arrastes ou borrões.

O material amplificado foi enviado para Laboratório de Resistência Bacteriana e Alternativas Terapêuticas – USP, para realizar teste de gênero através do processo MALDI-TOF. Obtendo o seguinte resultado:

Código d cepa isolada	Faixa de pontuação
S-001, S-002, S-011, S-029, S-051, S-071	<1,699
S-007, S-023, S-027, S-031, S-032, S-033, S-038, S-040, S-041, S-042, S-044, S-046, S-054, S-056, S-061, S-066, S-073, S-080, S-085, S-089, S-097	1,699-2,300
S-053	>2,300

Através da espectrometria de massa (MALDI-TOF) a análise de células bacterianas ou extratos bacterianos nos quais biomarcadores moleculares permite a detecção de peptídeos ou proteínas ribossômicas, permitindo a identificação em menor tempo e eficiência (PINTO, 2010).

Através da semeadura dos isolados em meio SS, foi obtido colônias características de *Salmonella* spp., assim colônias isoladas foram sujeitas ao processo de extração de DNA, conforme observado na Figura 1. Com o procedimento foi possível gerar a visualização dos seus pares de bases, com tudo as amostrar foram submetidas pelo processo do MALDI-TOF. Segundo Shell (2017), quando utilizado o MALDI-TOF para a identificação de um microrganismo, seu software, *Bruke BioTypers* é o responsável pela leitura da pontuação encontrada, esta identificação quando se é referido a gênero de bactérias, torna-se confiável em um intervalo entre 1,699 à 2,300, logo quanto mais próximo do seu máximo, uma melhor eficiência é encontrada.

Dentre as cepas analisadas 25% (7 cepas) apresentaram valores inferiores a 1,699 (S001, S002, S011, S029, S051 e S071) e uma cepa com valor acima de 2,300 (S053). Mesmo obtendo uma pontuação inferior a 1,699 ou acima de 2,300, os isolados estão dentro de uma identificação não confiável, porém não é desconsiderada, pois os valores foram próximos ao intervalo confiável. Analisando a Tabela 1, é possível notar que a performance obtida das 28 amostras foi de 78,5% de exatidão, e 21,4% dos isolados estão no grupo considerado não confiável, logo realizando uma comparação com as placas após crescimento (Figura 1) e a extração de DNA (Figura 1), ocorre a probabilidade da ocorrência de *Salmonellas* na porcentagem do grupo não confiável.

CONCLUSÃO

Através das pesquisas realizadas, conclui-se que as práticas aplicadas de microbiologia para reativação e isolamento de *Salmonella* spp., obteve êxito, pois os resultados alcançados foram próximos aos encontrados na literatura. Com relação a aplicação das ferramentas moleculares na taxonomia dos microrganismos, foram eficientes em todas as 28 amostras, obtendo o material genético esperado, e proporcionando a realização da identificação de gênero pelo uso do MALDI-TOF.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a todos os órgãos sendo o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), Fundação Araucária e a Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

REFERÊNCIAS

BENNETT, A.R., GREENWOOD, D., TENNANT, C., BANKS, J.G., BETTS, R.P. **Rapid and definitive detection of *Salmonella* in foods by PCR.** Letters in Applied Microbiology, v. 26, p. 437-441, 1998.

BITTENCOURT, J. V. M, BENETTI, T. M. **Ferramentas de biologia molecular.** p.44, 2016. Universidade Tecnológica Federal do Paraná do campus Ponta Grossa, 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Monitoramento da prevalência e do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos em enterococos e salmonelas isolados de carcaças de frango congeladas comercializadas no Brasil:** Editora do Ministério da Saúde, 2015. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/395481/Relat%25C3%25B3rioPrebaf-vers%25C3%25A3ofinal-ar2012.pdf/f6bb5296-e633-4f7b-b81f-48a99430da6a>> Acesso em 10 junho. 2020.

CANADA.T. Identification and taxonomic classification of microorganim(s) represented for use as suplementes inder the Fertilizers Act. Disponível em: <<https://www.inspection.gc.ca/plant-health/fertilizers/trade-memoranda/t-4-126/eng/1346524491267/1346527009874>> Acesso em: 10 junho. 2020.

COSTA, M.R.; MOURA, E.F. **Manual de extração de DNA.** Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2001. 24p. (Embrapa Ariiazônia Oriental. Documentos, 89).

PINTO, T. J. A.; KANEKO, T. M.; PINTO, A. F. **Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos.** 3 ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2010. 780.

DAMER, J. S. R et al. **Contaminação de Carne Bovina Moída Por Escherichia coli e Spp.** REVISTA CONTEXTO & SAÚDE. v. 14 n. 26 p. 20-27. 2014.

EMBRAPA. **Guia ilustrado para isolamento de Salmonella spp. de origem avícola.** Embrapa Suínos e Aves, Concórdia, SC .2016. Disponível em: <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1065434>> Acesso: 16 de junho 2020.

MCCAIN, C. S. and Powell, K. C. (1990) **Asymptomatic Salmonellosis in Healthy Adult Horses.** Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 2(3), pp. 236–237.

MICHAEL, G. B. et al. **Comparison of different selective enrichment steps to isolate *Salmonella* sp. from feces of finishing swine.** Braz. J. Microbiol., São Paulo, v. 34, n. 2, p. 138-142, June 2003.

MOREIRA, A. P. O. ***Salmonella* sp. em frangos de corte de um dia de idade na região metropolitana de Fortaleza-CE.** Acta Scientiae Veterinariae. 2003.

SHELL WS, SAYED ML, ALLAH FMG, GAMAL FE, KHEDR AA, SAMY AA, ALI AHM (2017) **Matrix-assisted laser desorption-ionization-time-of-flight mass spectrometry as a reliable proteomic method for characterization of *Escherichia coli* and *Salmonella* isolates.** Veterinary World, 10(9): 1083-1093ALENCAR, L. H.

VAN AMSON, G.; HARACEMIV, S.M.C.; MASSON, M.L. **Levantamento de dados epidemiológicos relativos à ocorrências/ surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTAs) no Estado do Paraná Brasil, no período de 1978 a 2000.** Ciência e Agrotecnologia, v.30, p.1139-1145, 2006.