LUÍS FELIPE ZUCCOLO PASCHOAL DA COSTA

METODOLOGIA MICROBIOLÓGICA CONVENCIONAL E REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR) NA DETECÇÃO DE SALMONELLA SP. A PARTIR DE CALDOS DE ENRIQUECIMENTO – TETRATHIONATO E RAPPAPORT-VASSILIADIS

Orientador: Prof. Ass. Dr. José Paes de Almeida Nogueira Pinto

Botucatu

2011

LUÍS FELIPE ZUCCOLO PASCHOAL DA COSTA

METODOLOGIA MICROBIOLÓGICA CONVENCIONAL E REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR) NA DETECÇÃO DE SALMONELLA SP. A PARTIR DE CALDOS DE ENRIQUECIMENTO – TETRATHIONATO E RAPPAPORT-VASSILIADIS

Trabalho de Conclusãode Curso de Graduação apresentado à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade "Júlio de Mesquita Filho",Campus de Botucatu, SP, para obtenção do grau de médico veterinário

Área de concentração: Inspeção Sanitária dos Produtos de Origem animal

Orientador: Prof. Ass. Dr. José Paes de Almeida Nogueira Pinto

Coordenador de Estágios:Profa. Dra. Jane Megid

Botucatu

2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE*

Costa, Luís Felipe Zuccolo Paschoal da.

Metodologia microbiológica convencional e reação em cadeia pela polimerase (PCR) na detecção de *Salmonellasp*. a partir de caldos de enriquecimento – Tetrathionato e Rappaport-Vassiliadis / Luís Felipe Zuccolo Paschoal da Costa. – Botucatu : [s.n.], 2011

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado – Medicina Veterinária) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: José Paes de Almeida Nogueira Pinto

Capes: 50505009

1. Alimentos - Microbiologia. 2. Produtos animais - Inspeção. 3. Salmonela. 4. Reação em cadeia de polimerase.

Palavras-chave: Inspeção sanitária dos produtos de origem animal; Microbiologia de alimentos; PCR; Salmonella.

Faz o que tu queres, há de ser tudo da lei. Todo homem é um indivíduo único e tem direito a viver como quiser

AleisterCrowley
(1875 - 1947)

PAES, JOSÉ. *Metodologia microbiológica convencional e reação em cadeia pela polimerase (PCR) na detecção de Salmonellasp. a partir de caldos de enriquecimento – Tetrathionato e Rappaport-Vassiliadis*, Botucatu, 2011 20p. Trabalho de conclusão de curso de graduação (Medicina Veterinária, Área de Concentração: Inspeção Sanitária dos Produtos de Origem Animal)– Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, UniversidadeEstadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

RESUMO

O aumento progressivo no consumo e na produção de carne de frango ao longo dos anos trás consigo um aumento na ocorrência de enfermidades transmitidas por alimentos (ETAs), dentre elas a salmonelose. A salmonelose ocorre devido à ingestão de produtos contaminados, principalmente pelo consumo de carne de frango cujo processamento e preparo para o consumo não foram eficazes na eliminação de patógenos. Existe, então, uma necessidade de desenvolvimento de métodos mais sensíveis e mais rápidos para a detecção de patógenos contaminantes como forma de garantir a qualidade dos produtos oferecidos aos consumidores. Este trabalho teve como objetivo analisar o efeito do uso de meios de enriquecimento na detecção de patógenosem amostras de carne de frango naturalmente contaminadas. Foi coletado um total de 65 amostras que foram submetidas a um enxágue com 370 mL de água peptonada tamponada (APT) 1%, de acordo com a metodologia convencional. Estas amostras passaram pelos meios de enriquecimento Rappaport-Vassiliadis (RV) e Tetrathionato (TT) e analisadas pelo método convencional e pelo método molecular (PCR). Das 65 amostras analisadas, 34 (52%) foram positivas quando analisadas pelo método

convencional e 45 (69%) foram positivas quando analisadas pelo método de PCR. Dentre as 45 amostras positivas pela PCR, o enriquecimento por TT foi positivo para 44 amostras e o enriquecimento por RV foi positivo para apenas 32 amostras. Já pela metodologia convencional, 34 amostras foram positivas, dentre elas, 31 foram positivas pelo RV e 29 foram positivas pelo TT.

Palavras chave: Microbiologia, *Salmonella*, PCR, enriquecimento, Rappaport-Vassiliadis, Tetrethionato,

PAES, JOSÉ. *Conventional microbiological methodology and polimerasis chain reaction (PCR) on the detection of* Salmonella sp*. from enrichment broths – Tetrathionate and Rappaport-Vassiliadis*, Botucatu, 2011 20p. Trabalho de conclusão de curso de graduação (Medicina Veterinária, Área de Concentração: Inspeção Sanitária dos Produtos de Origem Animal)– Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, UniversidadeEstadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

ABSTRACT

The progressive increase in consumption and production of poultry meat in later years comes forth with an increase of the occurrence of foodborne diseases, including salmonellosis. Salmonellosis is caused by the ingestion of contaminated products, mainly by the consumption of poultry meat which processing and preparation for consumption were not effective to eliminate pathogens. Thus, there is a need for the development of faster more sensitive methods of detection of pathogens as a way to ensure the quality of the food offered to consumers. The goal of this essay was to evaluate the effect of enrichment broths on naturally contaminated poultry meat samples. A total of 65 samples was collected, these samples were rinsed with 370 mL of buffered peptone water (BPS) 1% according with the traditional methodology. All of the samples were enriched with both Tetrathionate (TT) and Rappaport-Vassiliadis (RV) and all were analyzed by the convencional identification method and polimerasis chain reaction (PCR). Of the 65 analized samples, 34 (52%) were positive when analized by the conventional method, while 45 (69%) were positive when analized by the PCR. Amongst the 45 positive PCR samples, 44 samples were positive when enriched with TT, while just 32 samples were positive when

enriched by RV. Of the 34 positive conventional samples, 29 samples were positive when enriched by TT and 31 were positive when enriched by RV.

Keywords: Microbiology, Salmonella, PCR, enrichment, Rappaport-Vassiliadis, Tetrathionate

Sumário

Resumo.....3

Abstract..... 5

1.Introdução.....8

2.Material e métodos..... 10

3.Resultados..... 15

4.Conclusão..... 15

5.Referências bibliográficas..... 17

1. Introdução

Pode-se notar um aumento significativo do consumo de carne de frango nos últimos anos. Aumento este, que se deve à qualidade da carne de frango, ao preço mais baixo e à maior aceitação por parte do consumidor quando comparada, por exemplo, com a carne suína cujo consumo no Brasil é inferior ao da carne de frango. (BUZBY, 2011; SILVA, 1998)

No entanto, com o aumento da produção, comercialização e consumo de carne de frango pode-se observar um aumento simultâneo na ocorrência de enfermidades transmitidas por alimentos (ETA) oriundas de produtos contaminados e falhas no processamento desses produtos. (KIMURA, et. al., 2004)

Dentre os principais patógenos responsáveis pela ocorrência de ETA destaca-se o gênero *Salmonella*sp. pela facilidade de colonização do trato entérico de aves, aumentando o potencial de contaminação de carcaça e ovos e também pela grande morbidade entre os animais de uma granja com a presença de salmonela sp. (KIMURA, et. al., 2004)

*Salmonella*é um bacilo gram-negativo não esporulado e, em sua maioria, flagelado. Seu principal reservatório é o trato gastro intestinal de humanos e animais, principalmente aves e suínos (FRANCO & LANDGRAF, 1996). O gênero compreende mais de 2500 sorovares (HERIKSTAD, et al., 2002), abrigando os causadores da febre tifóide (*S.* Typhi), das febres entéricas (*S.* Paratiphy A, B e C) e das enterocolites clássicas, as chamadas salmoneloses(FRANCO & LANDGRAF, 1996).

Embora a tecnologia empregada no beneficiamento dos produtos avícolas tenha se desenvolvido consideravelmente nas últimas décadas, as características do processo de produção propiciam consequências indesejáveis como a contaminação microbiológica destes alimentos por diversos microrganismos, destacando-se *Salmonella*(SILVA, 1998; McKEE, 2007).

A detecção de*Salmonella*através de métodos microbiológicos convencionais é dispendiosa, requerendo até 7 dias para obtenção de resultados (FRESCHI et al., 2005), e podem apresentar baixa sensibilidade para amostras com baixos níveis de contaminação (D'AOUST, 1992).

Quanto à metodologia de coleta escolhida para este trabalho, o método de enxágue é visto como o mais adequado para a detecção de patógenos em carcaça inteira, visto que toda a carcaça entra em contato com a APT, aumentando a área analisada. Resultados superiores foram obtidos com o uso do método de enxágue quando comparados com métodos de excisão ou swab (RUSSEL et. al., 1997; D´AOUST et al., 1992).

Resultados discrepantes podem ser encontrados em diferentes trabalhos que fazem o uso de metodologias convencionais, discrepâncias que demonstram que as etapas de coleta e processamento das amostras podem sofrer interferências que acarretam em resultados variáveis. Simons et. al. (2003) avaliaram o procedimento proposto pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA), no qual o enxágue é realizado com 400 mL de APT e, posteriormente, uma alíquota de 30 mL é retirada e utilizada para as análises, com um método no qual o enxágue é realizado com 500 mL de APT e todo o volume foi utilizado na detecção de salmonella. Neste caso, o método proposto pelo USDA obteve resultados inferiores.

No Brasil, a metodologia preconizada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), através da Instrução Normativa 70 de 2003, determina que a amostragem seja feita pela coleta de 25 g de partes da carcaça (região interna e externa das asas, coxa-sobrecoxa, cloaca, peito e pescoço), mas não expressa os motivos desta determinação, visto que o processamento por esse método pode inviabilizar o patógeno, gerando um resultado falso-negativo (RUSSEL et. al., 1997).

Em contrapartida, alguns autores demonstram que o método de coleta de 25g de amostra de pele é menos laborioso e exige uma quantidade menor de diluente, sendo assim, um método mais viável, financeiramente. (SARLIN et. al., 1998).

Sendo assim, fica clara a necessidade do desenvolvimento de um método mais específico, sensível e acessível para a detecção de patógenos nas indústrias de alimentos, visto que existe um aumento progressivo no consumo de carne de frango e também pela maior incidência de salmonelose nos países industrializados (TAUXE, 1991).

2. Material e Métodos

2.1. Coleta das amostras

As amostras foram coletadas de um frigorífico sendo um total de 65 carcaças de frango coletadas logo após a etapa de pré-resfriamento (chiller). As amostras passaram pela etapa de enxágue no local da coleta.

2.2. Análise Microbiológica para *Salmonella*

A pesquisa de Salmonellasp. foi realizada segundo a metodologia preconizada por Andrews et. al. (1998), compreendendo as seguintes etapas descritas a seguir:

2.2.1.Pré-enriquecimento

Cada carcaça foi transferida para um saco plástico estéril e submetida a um processo de enxágue, realizado com 300mL de água peptonada tamponada estéril a 1% por 3 minutos. O líquido de enxágue de cada carcaça foi incubado a 35ºC por 18-24h.

2.2.2. Enriquecimento Seletivo

0,1 mL e 1mL do líquido pré-enriquecido foram transferidos para tubos de ensaio contendo 10 mL de caldo Rappaport-Vassiliadis (RV) e Tetrationato (TT) respectivamente, sendo a incubação realizada a 42ºC (RV) e 43ºC (TT), por 18 – 24h.

2.2.3.Plaqueamento Seletivo

Os caldos de enriquecimento seletivo foram estriados, com alça de níquel-cromo, na superfície de placas contendo ágar Bismuto de Sulfito (BS), ágar Xilose-Lisina-Desoxicolato (XLD), Agar MLCB com incubação de ambos a 35ºC por 18-24h.

2.2.4. Identificação bioquímica

As colônias características de *Salmonella*sp. foram repicadas para os ágares TSI (Triple Sugar Iron) e LIA (Lisina Iron Agar), sendo os mesmos incubados a 35ºC por 18 – 24h. Também foram realizados os seguintes testes bioquímicos: produção de indol, reação de Vermelho de Metila e de Voges-Proskauer, utilização de citrato, produção de urease, utilização de glicose e lactose, observação do movimento e produção de fenilalanina desaminase.

2.2.5.Soroaglutinação

Será realizada empregando-se antissoro polivalente flagelar (Antígeno H) e somático (Antígeno O).

2.3. Detecção da presença de *Salmonella*pela PCR

A pesquisa de *Salmonellasp*. foi realizada segundo a metodologia preconizada por Arnold et. al. (2004), compreendendo as seguintes etapas descritas a seguir:

2.3.1. Extração e purificação de DNA

A pesquisa de *Samonella* nos alimentos pela PCR foi realizada a partir dos caldos de enriquecimento Rappaport-Vassiliadis e Tetrationato.

Para a extração de DNA, 1 ml de cada um dos caldos foi centrifugado a 10.000g por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado, o *pellet* (sedimento) ressuspendido em 1ml de solução tampão de fosfato (PBS – 0,146M NaCl, 0,01M PO_4^{2-} , pH 7,2) e centrifugado a 10.000g por 5 minutos. Esse processo foi repetido mais duas vezes. Em seguida o sobrenadante foi novamente desprezado e o *pellet*ressuspendido em 0,2ml de solução de lise (50 mM Tris-H-Cl, 1mM EDTA, 0,025% Tween, 0,2 mg proteinase K). As amostras foram incubadas em banho-maria a 56°C por uma hora para ação da proteinase K. Logo após, a temperatura foi elevada para 95°C e mantida por 10 minutos para interromper a ação enzimática. Para finalizar a extração de DNA, as amostras foram novamente centrifugadas (13.000g por 5 minutos). O sobrenadante contendo o DNA extraído foi retirado e armazenado em tubos de microcentrífuga 0,5ml (Axygen) para a realização da PCR. 2.3.2 Amplificação do ácido nucléico (PCR)

2.3.2. Amplificação do ácido nucléico (PCR)

Para a realização da PCR, foi preparado um “mix” com os seguintes reagentes: 15µl de água ultra pura autoclavada (Milli-Q Plus - Millipore), 1,25µl oligonucleotídeo iniciador “sense” (*Primer*$InvA_1$, 10µmol), 1,25µl oligonucleotídeo iniciador ”antisense” (*Primer* $InvA_2$, 10µmol) (Tabela 2), 1µl de Taq DNA-polimerase (Biotools), 0,75µl de $MgCl_2$ (Biotools), 0,25µl de dNTP Mix (GEHealthCare), 2,5µl de tampão de Reação 10X (Biotools). A este “mix” foram adicionados 3µl da amostra de DNA. Em todas as reações foram utilizados controles positivos e negativos, com a substituição da amostra por uma cepa padrão de *Salmonella*(ATCC 13076) e por 3µl de água ultra puraautoclavada (Milli-Q Plus, Millipore), respectivamente.

Tabela 1 – Sequência dos *primers*InvA e tamanho do produto da reação.

	Sequência dos *primers*(Inv A)	Tamanho do produto amplificado
Inv A_1	5' TCA TCG CAC CGT CAA AGG AAC 3'	284pb
Inv A_2	5' GTG AAA TTA TCG CCA CGT TCG G 3'	

A amplificação foi realizada no termociclador PTC-100 (MJ Research Inc.) do Laboratório de Diagnóstico Molecular (Departamento de Microbiologia e Imunologia – UNESP, Botucatu). A incubação inicial ocorreu a 94°C por 5 minutos, logo após foi dado início à incubação cíclica (35 ciclos) com 94°C por 30 segundos para desnaturação do DNA, 60°C durante 30 segundos para anelamento do *primer* e 72°C por 30 segundos para formação da nova fita de DNA (extensão) e uma extensão final de 72°C por 4 minutos.

2.3.3. Eletroforese

Os produtos obtidos pela PCR foram submetidos à eletroforese (Electrophoresis Power SupplyModel EPD 600 - Amersham-Pharmacia Biotech Inc.) em gel de agarose 1,5%. (BioAmerica Inc.) e solução tampão de Tris- Ácido Bórico-EDTA 1X (TBE – 0,1M Tris, 0,08M Ácido Bórico, 1mM EDTA) por aproximadamente uma hora e meia.

Foi utilizado o SYBR Green I 10X (Invitrogen) adicionado às amostras como revelador, em substituição ao brometo de etídio pelo fato deste ser altamente mutagênico. Antes de ser aplicada no gel de agarose, 8µl da amostra foram misturados a 1µl de SYBR Green I 10X e deixados por 15 minutos sob proteção da luz, os fragmentos de DNA foram comparados com marcadores de DNA de 100 pares de base (Low Ranger 100bp DNA Ladder – Invitrogen). A visualização dos produtos amplificados foi realizada em fotodocumentador (Alphaimager – Alpha esasy FC Software – AlphaInotech Corporation).

3. Resultados

Das 65 amostras analisadas, a metodologia convencional detectou um total de 34 (52%) amostras positivas, já a PCR detectou um total de 45 (69%) amostras positivas, demonstrando uma maior sensibilidade da técnica.

Em relação aos caldos de enriquecimento, na metodologia convencional, de um total de 34 amostras positivas, 29 (85,3%) amostras foram detectadas a partir do TT e 31(91,1%) amostras foram positivas a partir do RV.

Pela PCR, de um total de 45 amostras positivas, 44 (97,7%) amostras foram positivas a partir do TT, enquanto apenas 32 (71%) foram positivas a partir do RV.

Tabela 2 – resultados obtidos a partir da metodologia convencional e PCR, com o uso de caldos de enriquecimento TT e RV

	Tetrathionato	**Rappaport-Vassiliadis**
PCR	44/45 (97,7%)	32/45 (71%)
Convencional	29/34 (85,3%)	31/34 (91,1%)

4. Conclusão

Os resultados demonstram que, pelo método convencional, não existe uma diferença significativa quanto ao uso dos diferentes caldos de enriquecimento, já que a sensibilidade do método se mantém estável.

Quanto à PCR, pode-se observar uma grande sensibilidade quando foi utilizado o caldo TT, porém o mesmo não se observa com o uso de RV, já que a sensibilidade foi semelhante à do método convencional.

Esse resultado é discutível, já que a metodologia de PCR é muito sensível e passível de interferências. Acredita-se que possa haver alguma

substância inibitória da PCR no caldo RV, visto que existe uma gama de fatores inibitórios da PCR (Wilson, 1997)

Fica clara a maior sensibilidade da metodologia molecular em relação ao método convencional, principalmente quando associada ao TT. Por outro lado, são necessários novos testes para determinar se essa sensibilidade pode ser reproduzida, já que os resultados obtidos pela PCR foram mais variáveis do que os obtidos pela metodologia convencional.

5. Referênciasbibliográficas

BUZBY, J. and WELLS H. F., Food Availability (Per Capita) Data System. **U.S. Department of Agriculture (USDA)**. Economic Research Service (ERS).Disponívelem: <http://www.ers.usda.gov/Data/FoodConsumption>. Acesso em: 12 ago. 2011.

SILVA, J. A. Microrganismos patogênicos em carne de frangos. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.12, n.58, p.9-14, 1998.

AKIKO C. KIMURA, VASUDHA REDDY, RUTHANNE MARCUS, PAUL R. CIESLAK, JANET C. MOHLE-BOETANI,Chicken Consumption Is a Newly Identified Risk Factor for Sporadic *Salmonella enterica*Serotype Enteritidis Infections in the United States: A Case-Control Study in FoodNet Sites, **Clinical Infectious Diseases,** v. 38 (Suppl 3), p.244–52, 2004.

FRANCO B. D. G. M.; LANDGRAF M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: ATHENEU, 1996, 182p.

HERIKSTAD, H.; MOTARJEMI, Y.; TAUXE, R.V. Salmonella surveillance; a global survey of public health serotyping.**Epidemiology and infection.**v.129, p.1-8, 2002.

McKEE, L., General attributes of fresh and frozen poultry meat. In: NOLLET, L.M.L. et al. (Eds). **Handbook of meat, poultry and seafood quality.**Anais Blackwell Publishing, 2007.p.429-437.

FRESCHI, C.R.; CARVALHO, L.F.O.S.; OLIVEIRA, C.J.B. Comparison of DNA-extraction methods and selective enrichment broths on the detection of Salmonella Typhimurium in swine feces by polymerase chain reaction (PCR).**Brazilian journal of Microbiology**., v.36, 2005, p .363-367.

D'AOUST, J.Y. **Commercial diagnostic kits for the detection of foodborne salmonella.*Proceedings of conference Salmonella and Salmonellosis.*** In: Salmonella and Salmonellosis Symposium, September 15–17,1992,Ploufragen, France, p.9–19.

RUSELL, S.M.; COX, N.A. and BAILEY, J.S..Sampling poultry carcasses and parts to determine bacterial levels.**Applied Poultry Research**, 6, 234-237, 1997.

SIMMONS, M., FLETCHER, D.L. CASON, J.A. and BERRANG, M. E., Recovery of Salmonella from Retail Broilers by a Whole-Carcass Enrichment Procedure. **Journal of food protection**, v.66, 2003, p.446-450.

SARLIN, L. L., BARNHART, E. T., CALDWELL, D. J., MOORE, R. W., BYRD, J. A., CALDWELL, D. Y., CORRIER, D. E., DELOACH, J. R. & HARGIS, B. M. Evaluation of alternative sampling methods for Salmonella critical control point determination at broiler processing. **Poultry Science**, 77, 1253-1257, (1998).

TAUXE, R. V., *Salmonella*: A postmortem pathogen. **Journal of Food Protection.**v.54, 1991, p.563-568.

ANDREWS, W.H.; JUNE, G.A.; SHERROD, P. et al. Salmonella. In: FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, (Ed). **Bacteriological Analytical Manual**.8.ed. Gaithersburg: AOAC International, 1998. p.5.01-5.20.

WILSON, I. G. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification.**Applied Environmental Microbiology**. 63, 3741–3751, 1997