

Fábio Sossai Possebon

**Metodologia Microbiológica Convencional e
Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) na
detecção de *Salmonella* spp em carcaças de
frango.**

Trabalho de Conclusão de 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

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

Fábio Sossai Possebon

**Metodologia Microbiológica Convencional e Reação
em Cadeia pela Polimerase (PCR) na detecção de
Salmonella spp em carcaças de frango.**

Área de Concentração: Inspeção de Produtos de Origem Animal

Trabalho de Conclusão de 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 de Produtos de Origem Animal

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

Coordenadora de Estágios: Profa. Dra. Jane Megid

Resumo

Salmonella é o agente etiológico responsável por uma das mais importantes Enfermidades Transmitidas por Alimentos (ETA), a Salmonelose, que gera conseqüências econômicas relevantes em vários países do mundo, inclusive no Brasil. Entre os alimentos veiculadores do patógeno, destacam-se a carne de aves. Nesse sentido, vários países têm desenvolvido Programas de Redução de *Salmonella* envolvendo a carne aviária. Tais Programas têm como base a pesquisa do patógeno nas carcaças produzidas, estabelecendo-se um limite máximo de amostras positivas a cada “set” analisado. A pesquisa de *Salmonella* nas amostras ocorre usualmente a partir de métodos microbiológicos convencionais, os quais costumam ser dispendiosos e demorados. Nos últimos anos vieram a se somar os chamados métodos rápidos como a Reação em Cadeia Pela Polimerase, que pode abreviar em muito o tempo de obtenção dos resultados, mostrando maior sensibilidade e especificidade em relação à metodologia convencional.

Palavras chave: *Salmonella*, frango, metodologia, PCR.

Abstract

Salmonella is the etiological agent responsible for one of the most important Food Borne Disease (FBD), Salmonellosis, which generates significant economic consequences in several countries, including Brazil. Poultry meat is one of the most important disseminators of the pathogen. Accordingly, several countries have developed programs trying to reduce the prevalence of *Salmonella* in poultry meat. Such programs are based on the research of the pathogen in the carcasses, establishing a maximum limit of positive samples at each set of analysis. The *Salmonella* scans are usually made using the conventional microbiological methods, which tend to be expensive and time consuming. In recent years were developed rapid methods such as polymerase chain reaction (PCR), which can greatly shorten the results time, showing greater sensitivity and specificity than conventional methodology.

Keywords: *Salmonella*, poultry, methodology, PCR

Sumário

Resumo	03
Abstract	04
1. Introdução	06
2. Revisão da Literatura	07
2.1 Análise Microbiológica Convencional para <i>Salmonella</i> spp.	08
2.1.1 Pré-enriquecimento	08
2.1.2 Enriquecimento Seletivo	09
2.1.3 Plaqueamento Seletivo	09
2.1.4 Identificação Bioquímica	09
2.1.5 Soroaglutinação	09
2.2 Detecção da presença de <i>Salmonella</i> pela PCR	10
2.2.1 Extração e Purificação do DNA	10
2.2.2 Amplificação do Ácido Nucléico	11
2.2.3 Eletroforese	11
3. Conclusão	12
4. Bibliografia	13

1. Introdução

Salmonella é o agente etiológico responsável por uma das mais importantes Enfermidades Transmitidas por Alimentos (ETA), com conseqüências econômicas relevantes em vários países do mundo, inclusive no Brasil (JAY, 2005; OPAS/OMS, 2007).

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 (ERIKSTAD, et al., 2002), abrigando os causadores da febre tifóide (*S. Typhi*), das febres entéricas (*S. Paratyphi A, B e C*) e das enterocolites clássicas, as chamadas salmoneloses (FRANCO & LANDGRAF, 1996).

Na América do Sul, dados do programa da Organização Mundial da Saúde (OMS) para a vigilância epidemiológica de *Salmonella* e de outros enteropatógenos mostram que, entre 2000 e 2004, houve um aumento de 43,5% no número de isolamentos do agente, que totalizaram 15.737, sendo os sorotipos de maior ocorrência *S. Enteritidis* (40%) e *S. Typhimurium* (16%) (OPAS, 2007).

Deste modo, as ETA e, especialmente, a salmonelose, tornaram-se motivo de discussão em todo o mundo, e tem se procurado estabelecer estratégias que permitam o controle das mesmas e, conseqüentemente, a garantia do fornecimento de alimentos inócuos para o mercado consumidor (MATHEUS et al., 2003).

Entre os alimentos veiculadores do patógeno, destacam-se a carne de aves, uma importante fonte de proteína animal, cujo consumo tem aumentado significativamente em todo o mundo nos últimos 25 anos, especialmente devido a seu preço, mais acessível em relação ao da carne bovina (SILVA, 2002; McKEE, 2007).

2. Revisão da Literatura

Inúmeras infecções por *Salmonella* são relatadas em humanos em decorrência do manuseio de carcaças de aves e seus produtos consumidos crus ou mal passados, reforçando ainda mais a sua importância (PARNISELLO et al., 2000). Estes fatores justificam uma intensa fiscalização e monitoramento dos segmentos da sua produção e de seus derivados.

Nesse sentido, vários países têm desenvolvido programas de redução de *Salmonella* envolvendo a carne de aves (WEGENER et al., 2003). No Brasil, este Programa é executado desde 2003, tendo sido instituído pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), através da Instrução Normativa nº70, de 6 de outubro de 2003 (BRASIL, 2003).

Tais Programas têm como base a pesquisa do patógeno nas carcaças produzidas, estabelecendo-se um limite máximo de amostras positivas a cada “set” analisado. A pesquisa de *Salmonella* nas amostras ocorre usualmente a partir de métodos microbiológicos convencionais, sendo que a estes nos últimos anos vieram a se somar os chamados métodos rápidos que utilizam diferentes princípios e podem abreviar em muito o tempo de obtenção dos resultados (RÜCKERT, 2006, KILNNER, 2008).

Saliente-se que a detecção de *Salmonella* através de métodos microbiológicos convencionais é dispendiosa, requerendo até 7 dias para obtenção de resultados (FRESCHI et al., 2005), sendo que os métodos empregados podem apresentar baixa sensibilidade para amostras com baixos níveis de contaminação (D’Aoust, 1992).

Entre os métodos rápidos, a Reação em Cadeia pela Polimerase (Polimerase Chain Reaction – PCR) tem se popularizado e tem se mostrado uma poderosa ferramenta para as análises microbiológicas

(PERSING, 1991). É um método eficaz para a detecção de *Salmonella* spp. em carne de frango, devido a sua alta sensibilidade e especificidade, possibilitando a obtenção de resultados em poucas horas (PERSING, et. al., 1993).

Segundo Chantal, et al. (2008), por exemplo, ao se proceder a análise de 120 amostras de produtos avícolas coletados na indústria, a PCR foi capaz de detectar 18 amostras positivas adicionais, que não haviam sido isoladas pelos métodos convencionais de cultura, confirmando a maior sensibilidade da técnica na detecção de *Salmonella*.

Oliveira, et al.(2003), ao comparar três genes de virulência (*invA*, *spvR* e *spvC*) de cepas de *Salmonella* Enteritidis isoladas de aves, suínos, humanos e alimentos, concluíram que todas as cepas isoladas possuíam o gene *InvA*, Salehi, et al.(2005) encontrou resultados semelhantes ao pesquisar a prevalência do gene em 30 amostras de carne de frango naturalmente contaminadas.

2.1 Análise Microbiológica Convencional para *Salmonella* spp.

A pesquisa de *Salmonella* spp. é convencionalmente realizada segundo a metodologia preconizada por Andrews et al. (1998), compreendendo as seguintes etapas descritas a seguir:

2.1.1 Pré-enriquecimento

As amostras são incubadas em Água Peptonada Tamponada a 1% (APT 1%) a 35°C por 18-24h.

2.1.2 Enriquecimento Seletivo

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

2.1.3 Plaqueamento Seletivo

Os caldos de enriquecimento seletivo são 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 35°C por 18-24h.

2.1.4 Identificação bioquímica

As colônias características de *Salmonella* spp. são repicadas para os ágars TSI (Triple Sugar Iron) e LIA (Lisina Iron Agar), sendo os mesmos incubados a 35°C por 18 – 24h. São ainda 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.

2.1.5 Soroaglutinação

É realizada empregando-se anti-soro polivalente flagelar (Antígeno H) e somático (Antígeno O).

2.2 Detecção da presença de *Salmonella* pela PCR

A pesquisa de *Salmonella* spp. será exemplificada segundo a metodologia preconizada por Arnold et al. (2004), compreendendo as seguintes etapas descritas a seguir:

2.2.1 Extração e Purificação de DNA

As amostras passam pelo processo de enriquecimento seletivo, com os caldos Rappaport-Vassiliadis e Tetracionato, como na metodologia convencional

Para a extração de DNA, 1 ml de cada um dos caldos é centrifugado a 10.000g por 10 minutos. O sobrenadante é desprezado, o *pellet* (sedimento) ressuspensionado 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 é repetido mais uma vez. Em seguida o sobrenadante é novamente desprezado e o *pellet* ressuspensionado em 0,2ml de solução de lise (50 mM Tris-H-Cl, 1 mM EDTA, 0,025% Tween, 0,2 mg proteinase K). As amostras são incubadas em banho-maria a 56°C por uma hora para ação da proteinase K. Logo após, a temperatura é elevada para 95°C e mantida por 10 minutos para interromper a ação enzimática. Para finalizar a extração de DNA, as amostras são novamente centrifugadas (13.000g por 5 minutos). O sobrenadante contendo o DNA extraído é retirado e armazenado em tubos de microcentrífuga 0,5ml para a realização da PCR.

2.2.2 Amplificação do ácido nucléico (PCR)

Para a realização da PCR, é preparado um “mix” com os seguintes reagentes: 15µl de água ultra pura autoclavada, 1,25µl oligonucleotídeo iniciador “sense” (*Primer InvA₁*, 10µmol), 1,25µl oligonucleotídeo iniciador “antisense” (*Primer InvA₂*, 10µmol), 1µl de Taq DNA-polimerase, 0,75µl de MgCl₂, 0,25µl de dNTP Mix, 2,5µl de tampão de reação 10X. A este “mix” são adicionados 3µl da amostra de DNA. Em todas as reações são utilizados controles positivos e negativos, com a substituição da amostra por uma cepa padrão de *Salmonella* (ATCC 13076) e por 3µl de água ultra pura autoclavada, respectivamente.

A amplificação é realizada no termociclador. A incubação inicial ocorrerá a 94°C por 5 minutos, logo após inicia-se a 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.

2.2.3 Eletroforese

Os produtos obtidos pela PCR são submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% 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.

Para a visualização, 8µl da amostra são misturados a 1µl de revelador (como brometo de etídio) e deixados por 15 minutos sob proteção da luz, sendo posteriormente aplicados no gel de agarose; a seguir, os fragmentos são comparados com marcadores de DNA de 100

pares de base. A visualização dos produtos amplificados é realizada em fotodocumentador.

3. Conclusão

A presente revisão de literatura revela que o método molecular para o diagnóstico da *Salmonella* spp. destaca-se como uma importante ferramenta para o controle do patógeno na cadeia produtiva aviária, propondo maior agilidade e praticidade na aplicação do Programa Nacional de Redução de Patógenos. A popularização da técnica resulta em uma opção cada vez mais confiável e financeiramente viável, sendo possível a utilização do mesmo como teste de triagem, tanto para o monitoramento da situação sanitária dos produtos, quanto para facilitar auditorias dos órgãos fiscalizadores e certificadores.

Bibliografia

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa no 70, de 06 de outubro de 2003. Brasília, 2003. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/servlet/VisualizarAnexo?id=1855>> Acesso em: 10 de agosto de 2011

CHANTAL, W. NDE, MOHAMED K. FAKHR, CURT DOETKOTT, CATHERINE M. LOGUE, Na Evaluation of Conventional Culture, invA PCR, and the Real-Time PCR IQ-Check Kit as Detection Tools for Salmonella in Naturally Contaminated Premarket and Retail Turkey. *J. Food Prot.* v.71, p. 386-391, 2008

D`Aoust, J. Y.; STOTLAND, P.; BOVILLE, A. Sampling methods for detection of *Salmonella* in raw chicken carcasses. **J. Food Sci.** v.47, n.5, p.1643-1644-1729, 1982

ERIKSTAD, H.; MOTARJEMI, Y.; TAUXE, R.V. Salmonella surveillance; a global survey of public health serotyping. *Epimiol. Infect.* v.129, p.1-8, 2002.

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

FRESH, C.R.; CARVALHO, L.F.O.S.; and OLIVEIRA, CJB. Comparison of DNA-extraction methods and Selective Enrichment broths on the detection of *Salmonella* Typhimurium in swine feces by polymerase chain reaction (PCR). *Braz. J. Microbiol.* [online]. 2005, vol.36, n.4, pp. 363-367. ISSN 1517-8382

JAY, J. M. Microbiologia de alimentos. 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 711p

KILNNER, M. Paralelos entre métodos fenotípicos, imunológicos e genotípicos para detecção rápida de *Salmonella* spp. em matrizes alimentares sem contaminação experimental: avaliação em condições reais e simultâneos de uso. 2008. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

MATHEUS, D.P.; RUDGE, A.C.; GOMES, S.M.M. Ocorrência de *Salmonella* spp em carne de frango comercializada no município de Bauru, SP, Brasil. Rev. Inst. Adolfo Lutz. v.62, n.2, p.111-115, 2003.

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. Ames: Blackwell Publishing, 2007. p.429-437

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). *Braz. J. Microbiol.* [online]. 2005, vol.36, n.4, pp. 363-367. ISSN 1517-8382.

OMS - ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Evaluaciones de riesgos de *Salmonella* em huevos u pollos para asar. Roma, 2005, 50p. (Serie de evaluación de riesgos microbiológicos, 1).

OPAS - ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. ORGANIZAÇÃO

MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Saúde nas Américas 2007. Washington: OPAS, v.1, 2007. Disponível em:
<<http://www.paho.org/HIA/archivosvol1/volregionalpor/SNA07%20Regional%20POR%20Cap%203.pdf>> Acesso em: 09 de Agosto de 2011.

PARNISELLO, P. J., ROONEY, R., QUANTICK, P. C., STANWELL-SMITH, R. Application of foodborne disease outbreak data in the development and maintenance of HACCP system. Int. J. Food Microbiol. v.59, p.221-234, 2000.

RÜCKERT, D. A. S. V., Comparação dos métodos microbiológico convencional, imunoenálise e reação da polimerase em cadeia (PCR) no monitoramento de *Salmonella* sp. em frangos durante o abate, Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Viçosa, 2006. Disponível em:
<http://www.tede.ufv.br/tesesimplificado/tde_busca/arquivo.php?codArquivo=367>
> acesso em: 09 de Agosto de 2011.

SALEHI, T.Z.; MAHZOUNIEH, M.; SAEEDZADEH, A. Detection of *InvA* Gene in Isolated *Salmonella* from Broilers by PCR Method. International Journal of Poultry Science. v. 4, p. 557-559, 2005.

SILVA, E. N.; DUARTE, A. *Salmonella Enteritidis* em aves: retrospectiva no Brasil. Rev. Bras. Cienc. Avíc. v.4, n.2, p.085 – 100, 2002

WEGENER, H.C.; HALD, T.; WONG, D.L.F.; MADSEN, M.; KORSGAARD, H.; BAGER, F.; GERNER-SMIDT, P.; MOLBAK, K. Salmonella control programs in Denmark. Emerg. Infec. Dis. v.9, p.774-779, 2003.