

CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DE CEPAS DE *Salmonella* Heidelberg DE ORIGEM AVÍCOLA

Carolyne Ferreira Dumont¹; Fernanda Aparecida Longato dos Santos²; Micaela Guidotti Takeuchi³; Mariana Comassio Chueiri⁴; Newton Nascentes Galvão⁵; Daise Aparecida Rossi⁶; Roberta Torres de Melo⁷

¹Graduanda, Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Uberlândia, Minas Gerais.

²Mestranda, Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Uberlândia, Minas Gerais.

³Doutoranda, Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Uberlândia, Minas Gerais.

⁴Graduanda, Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Uberlândia, Minas Gerais.

⁵Doutor, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), Brasília, Distrito Federal.

⁶Professora Doutora, Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Uberlândia, Minas Gerais.

⁷Professora Doutora, Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Uberlândia, Minas Gerais.

DOI: 10.47094/IICNNESP.2021/22

RESUMO

A salmonelose é uma das principais causas de gastroenterite de origem alimentar no Brasil e o sorovar *Salmonella* Heidelberg (SH) está envolvido em casos graves. O estudo objetivou avaliar aspectos genotípicos presentes em 20 cepas de SH isoladas de carne de frango comercializados pela indústria brasileira para determinar o perfil de virulência via PCR convencional e a proximidade genética por PFGE. Todas as cepas apresentaram os genes *ompC*, *invA*, *sodC*, *avrA*, *lpfA*, e *agfA*, já o gene *luxS* foi detectado em 70% destas. A presença de diferentes genes de virulência revela que este sorovar pode representar uma ameaça à saúde pública. Houve elevada diversidade genética entre as cepas, que se agruparam em seis pulsotipos com características epidemiológicas e moleculares comuns. Conclui-se que as cepas apresentaram perfil multivirulento, distinguível pelo *luxS* e distanciamento genético compatível aos desafios relacionados à capacidade adaptativa do sorovar e às dificuldades de controle na indústria avícola.

PALAVRAS-CHAVE: PFGE. Virulência. Saúde pública.

ÁREA TEMÁTICA: Epidemiologia.

INTRODUÇÃO

A Salmonelose é uma das principais doenças de origem alimentar que afeta humanos no mundo todo. Geralmente é causada pelo consumo de carne de frango contaminada por sorovares zoonóticos, representando um grave problema a saúde pública. *Salmonella* Heidelberg (SH) destaca-

se entre os sorovares por sua prevalência em países da América do Norte, Europa e no Brasil (ANTUNES *et al.*, 2016). O cenário torna-se pior diante da emergência de patógenos com perfis de virulência pertencentes a este sorovar.

São diversos os mecanismos moleculares envolvidos na virulência de SH. Entre estes genes, alguns são responsáveis por possibilitar o estabelecimento de doenças, como os genes de adesão (*lpfA*; *agfA*), invasão (*ompC*; *invA*) e colonização (*avrA*) (SUZUKI, 1994), enquanto outros permitem a manutenção da bactéria em ambientes adversos, como o gene (*luxS*) que permite a comunicação entre bactérias, a formação de biofilmes e a possibilidade de realizar trocas gênicas (BORGES *et al.*, 2018).

O Brasil é um importante exportador na cadeia produtiva avícola e, apesar das medidas rígidas de controle sanitário, houve aumento na quantidade de cepas de SH isoladas nos últimos anos. Assim, monitoramentos são fundamentais para a implantação de medidas de controle mais eficientes. Dada a importância e a emergência de SH, este estudo objetivou avaliar a proximidade genética e a virulência de linhagens de SH de origem avícola para discutir o perigo que podem representar à saúde pública.

METODOLOGIA

Foram avaliadas 20 cepas de SH, isoladas entre os anos de 2017 e 2018 em lotes de frangos de corte de oito unidades industriais (A, B, C, D, E, F, G e H) e cinco diferentes produtores (1, 2, 3, 4 e 5), com idades entre 11 e 46 dias. As cepas analisadas foram provenientes de *swab* de arrasto do aviário (17), amostra fecal (1), amostra de ceco (1) e amostra de peito (1). A identificação bioquímica e sorotipagem foram realizadas pelo Laboratório de Enterobactérias da Fundação Oswaldo Cruz, no estado do Rio de Janeiro (IOC/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil).

Para a detecção de genes de virulência, foi realizada a extração e purificação do DNA genômico usando o Wizard Genomic DNA Purification Kit® (Promega), seguidos da reação de PCR (10ng de DNA purificado), para detecção da presença dos genes *ompC* (biossíntese da proteína C da membrana externa), *avrA* (colonização da proteína efetora), *sodC* (eliminação de radicais livres), *invA* (invasão), *sefA* (adesão de fimbrias), *agfA* (fimbrias e biofilme), *lpfA* (adesão de fimbrias) e *luxS* (mecanismo de detecção de quórum).

As reações de PCR foram conduzidas utilizando o kit GoTaq® Green Master Mix (Promega) com volume final de 25µL. Posteriormente, foi realizada a amplificação em termociclador (*Eppendorf*): 94°C-5 min; 35 ciclos de amplificação: 94°C-45seg; 72°C- 90seg; 72°C-10min e extensão final a 72°C-10min. Os produtos amplificados foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1,5% (tampão de funcionamento TBE 0,5x Invitrogen) e o marcador de peso molecular 100bp (Invitrogen).

Para verificar a similaridade genética entre os isolados, foi utilizada a técnica Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) de acordo com o protocolo do PulseNet (CDC, 2017). Para essa técnica, as bactérias foram emblocadas em gel de agarose, seguida por digestão do DNA genômico a partir

do uso da enzima Xba1 (Invitrogen). Os fragmentos resultantes foram separados em gel de agarose 1% (SeaKem Gold®), em tampão TBE 0,5X, no equipamento CHEF DRIII (Bio-Rad®, Califórnia, Estados Unidos) por 18h (200 V, ângulo de 120°, 6V gradiente/cm e temperatura do tampão de 14°C). Posteriormente, os géis foram corados com brometo de etídio e as imagens reveladas em transiluminador (Loccus Biotechnology®) e avaliadas com o programa BioNumerics. A análise estatística foi realizada com o software GraphPad Prism, versão 8.0 (GraphPad Software, Estados Unidos), considerando nível de confiança de 95% na análise das variáveis.

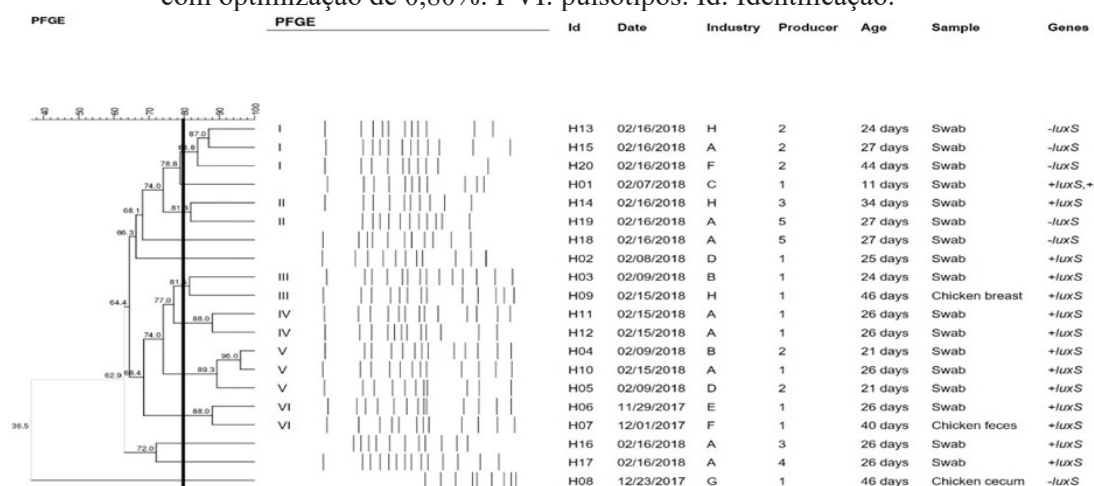
RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados evidenciaram a presença dos genes *ompC*, *invA*, *sodC*, *avrA*, *lpfA*, e *agfA* em todas as estirpes e o gene *luxS* em 70%. A presença dos genes *ompC* e *invA* era esperada pois ambos são utilizados para caracterizar o gênero e a capacidade de invadir os tecidos hospedeiros, respectivamente. O gene *sefA* não foi identificado nas cepas e está associado com o processo de adesão restrito aos serovares do grupo D, Enteritidis, Dublin, Moscovo e serotipos Blegdon (AMINI *et al.*, 2010). Entretanto, sua presença foi investigada devido à possibilidade de realizar recombinação genética, por meio de transferência horizontal de genes, que pode ser mais evidente quando os genes *sefABCD* apresentam G + C com aproximadamente 35,2%.

Indicando um risco potencial após a infecção, os genes *agfA* e *lpfA*, codificam proteínas associadas à fixação celular a superfícies abióticas e formação de biofilme para posterior colonização intestinal e expressão de virulência (YOO *et al.*, 2013). O gene *avrA* altamente conservado tem grande importância para a saúde pública devido sua capacidade de promover o escape do sistema imune do hospedeiro que se verifica por meio da indução de apoptose celular, limitando a resposta inflamatória à infecção (LABRIOLA; ZHOU; NAGAR, 2018). Concomitantemente, codifica-se proteínas efetoras essenciais para a infecção e proliferação bacteriana.

Observa-se na Figura 1, que parte das estirpes (30% - 6/20) apresentaram ausência do gene *luxS* (-*luxS*) que podem demonstrar formação de estruturas sésses pouco estáveis ou com baixa carga bacteriana comparativamente a estirpes com a presença do gene (+*luxS*). A proteína *luxS* está correlacionada com o controle e a sinalização do mecanismo de *quórum sensing*, que permitem a organização da população bacteriana e a estabilidade/maturidade da estrutura dos biofilmes (PARVEEN; CORNELL, 2011).

Figura 1: Dendrograma comparativo de 20 estirpes *Salmonella* Heidelberg indicando a presença ou ausência do gene *luxS*. Utilizou-se o coeficiente de semelhança de dados com tolerância de 1,5% e o método UPGMA com otimização de 0,80%. I-VI: pulsótipos. Id: Identificação.



Fonte: própria autoria

Para avaliação das semelhanças genotípicas através da tipagem por PFGE (> 80% de similaridade), estruturou-se o dendrograma baseado nas características genotípicas, no local de isolamento e na data da coleta (Figura 1). A análise de semelhança apresentou seis pulsótipos (I – VI), reunidos com duas ou três estirpes, demonstrando uma origem ou produtor comum cujo genótipo foi disseminado para unidades industriais diferentes. Exceção foi observada para o pulsótipo IV, que continha características epidemiológicas e moleculares comuns. Neste caso, a manutenção local do microorganismo em diferentes amostras pode ser ligada à contaminação cruzada.

As estirpes isoladas de diferentes anos não foram agrupadas no mesmo pulsótipo e o mesmo padrão aplicou-se para o produtor (exceto para os pulsótipos II e V) e para o painel genético (exceto para os pulsótipos III e IV).

CONCLUSÃO

O estudo demonstrou ampla distribuição de perfis multivirulentos de SH, distinguíveis somente ao potencial de formação de biofilmes. A alta heterogeneidade filogenética dos sorovares em curta variação temporal demonstra seu potencial recombinante e os desafios constantes para o controle de SH na produção avícola.

PRINCIPAIS REFERÊNCIAS

ANTUNES, P. ANTUNES, P. *et al.* **Salmonellosis: the role of poultry meat.** (*s.l.*): Clinical Microbiology and Infection, 2016.

AMINI, K. *et al.* **Molecular detection of invA and spv virulence genes in Salmonella enteritidis isolated from human and animals in Iran.** (*s.l.*): African Journal of Microbiology Research, 2010.

BORGES, K. A. *et al.* **Biofilm formation capacity of Salmonella serotypes at different temperature conditions.** Rio de Janeiro: Pesquisa Veterinária Brasileira, 2018.

CDC. Standard Operating Procedure for PulseNet PFGE of Escherichia coli O157: H7, Escherichia coli non-O157 (STEC), Salmonella serotypes, Shigella sonnei and Shigella flexneri. v. 157, p. 1–16, 2017.

LABRIOLA, J. M.; ZHOU, Y.; NAGAR, B. **Structural Analysis of the Bacterial Effector AvrA Identifies a Critical Helix Involved in Substrate Recognition.** Washington: Biochemistry, 2018.

PARVEEN, N.; CORNELL, K. A. **Methylthioadenosine/S-adenosylhomocysteine nucleosidase, a critical enzyme for bacterial metabolism.** (*s.l.*): Molecular Microbiology, 2011

SUZUKI, S. **Pathogenicity of Salmonella enteritidis in poultry.** (*s.l.*): International Journal of Food Microbiology, 1994.

YOO, A. Y. *et al.* **Role of sigma factor E in regulation of Salmonella Agf expression.** (*s.l.*): Biochemical and Biophysical Research Communications, 2013.