

PESQUISA DE GENES DE VIRULÊNCIA EM *SALMONELLA* HADAR EM AMOSTRAS PROVENIENTES DE MATERIAL AVÍCOLA

CESCO, M.A.O¹; ZIMERMANN, F.C¹; GIOTTO, D.B^{*1}; GUAYBA, J¹; BORSOI, A¹; ROCHA¹, S.L.S; CAMILOTTO, E¹; DALMOLIN, J¹; MORAES, H.L.S¹. NASCIMENTO, V.P¹.

RESUMO

A salmonelose é uma das mais importantes zoonoses, mundialmente reconhecida por sua implicação em saúde pública e também por resultar em perdas econômicas na produção animal. Dentro do gênero *Salmonella*, que é constituído por mais de 2.500 sorovares, o sorovar Hadar tem merecido atenção, pois foi o terceiro mais isolado no mundo em 1995 (HERIKSTAD et al., 2002) e o terceiro mais isolado em humanos entre 1997 e 2001 na Espanha (ECHEITA et al., 2005). Em 2005, também na Espanha, mais de 200 casos de salmonelose em humanos foram provocados pelo sorovar Hadar, transmitido pelo consumo de carne de frango (EUROSURVEILLANCE, 2005). No Brasil, mais especificamente no Rio Grande do Sul, Nascimento et al. (1996) relataram a prevalência de *Salmonella* em carcaças e partes de frango, sendo a *Salmonella* Hadar a segunda mais isolada (26%). O resultado das infecções por *Salmonella* é determinado pelo status do hospedeiro e o status da bactéria. Enquanto idade, genética e fatores ambientais podem determinar o status do hospedeiro, o status das bactérias é determinado pelos chamados fatores de virulência. No presente trabalho foram pesquisados três genes de virulência relacionados à *Salmonella*, os genes fimbriais *invA*, *agfA* e *lpfA*. Foram testadas 45 amostras isoladas a partir de mecônio, carcaças e cortes de frango no Rio Grande do Sul, pelo Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária (CDPA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Os testes foram feitos através da Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) e as leituras foram feitas em gel de agarose a 1,2% corados com brometo de etídio e visualizados sob luz ultravioleta. Os resultados obtidos mostram a presença dos três genes em todas as amostras de *Salmonella* Hadar testadas.

INTRODUÇÃO

Bactérias do gênero *Salmonella* são bacilos Gram negativos que compõem um dos grupos mais complexos das *Enterobacteriaceae*, com mais de 2.500 sorotipos descritos. Essas bactérias estão amplamente dispersas na natureza e podem ser encontradas no trato gastrointestinal de mamíferos, répteis, aves e insetos (KONEMAN, 1997). É também uma das bactérias mais extensivamente estudadas em termos de fisiologia, genética e estrutura celular, sendo uma das bactérias patogênicas melhor caracterizadas em termos de virulência (DARWIN & MILLER),

(1)- Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária – CDPA/UFRGS; Av. Bento Gonçalves, n. 8824, Agronomia, CEP 91540-510, Porto Alegre, RS.

Correspondente: Marco Aurélio de Oliveira Cesco, telefone: 51- 92841982, email: maocesco@yahoo.com.br

1999).

A virulência das salmonelas é multifatorial e complexa, incluindo presença de fímbrias, de flagelos, mobilidade, habilidade de penetrar e replicar nas células epiteliais, resistência à ação do complemento, produção de entero, cito e endotoxinas (RODRIGUES, 2005). Alguns desses fatores são chamados de “clássicos” (VAN ASTEN & DIJK, 2005) e podem estar localizados em elementos genéticos transmissíveis, como *transposons*, plasmídeos ou bacteriófagos, assim como fazer parte de regiões específicas do cromossomo da bactéria, as chamadas Ilhas de Patogenicidade (IP), locais que agrupam a maioria dos genes de virulência (VAN ASTEN & VAN DIJK, 2005).

As IPs constituem-se por um grupo de genes envolvidos em codificar fatores específicos de virulência. Até o presente momento, cinco IPs foram descritas em *Salmonella* (HANSEN-WESTER; HENSEL, 2001). A IP-1 encontra-se presente em *Salmonella bongori* e todas as variedades de *Salmonella enterica*. Os operons *Inv* (*invasibility*) e *Hil* (*hiper invasibility*) estão presentes nesta ilha, em meio a outros genes e proteínas. O gene *invA* é o primeiro no operon, onde os genes *invA*, B e C estão arrançados na mesma unidade transcricional e o gene *invD* está localizado em uma unidade transcricional diferente (GALAN et al., 1992). Estudos demonstraram que a *Salmonella* Typhimurium tem como célula alvo, para entrada no epitélio intestinal de camundongos, a célula M, e que é necessária a presença do gene *invA* para uma eficiente invasão dessas células (CLARK et al., 1998). As células M da mucosa intestinal são ligadas aos folículos linfóides, que fazem a mediação da resposta inflamatória, recrutamento de granulócitos, macrófagos, monócitos e linfócitos (CALDWELL et al. 2004).

Outro importante influenciador da invasibilidade das *Salmonella* são os sistemas de secreção tipo III (SSTT) (WALLIS & GALYOV, 2000). O SSTT -1, é codificado por alguns genes, inclusive o *invA*, localizado na IP-1 e estes sistemas são responsáveis pela secreção de proteínas bacterianas que promovem a entrada da bactéria para o interior das células alvo.

Assim como outras bactérias patogênicas, as *Salmonellas* produzem apêndices de membrana chamados de fímbrias, mais curtos que os flagelos. São compostas por apenas uma proteína estrutural, a pilina, e são dispostas de maneira helicoidal na superfície das bactérias gram-negativas (TORTORA, et al. 2000). As fímbrias têm um papel fundamental na adesão às superfícies sendo importantes na interação bactéria-hospedeiro, persistência ambiental, formação de biofilmes, colonização e invasão de células (GIBSON et al., 2007).

Em salmonelas já foram identificados 20 operons fimbriais. Fazendo parte dos operons fímbrias *Salmonella*-específicos, está o *agf* (*aggregative fimbriae*), que codifica a fímbria SEF17 ou Tafi (*thin aggregative fimbriae*), a qual permite estabilidade à salmonela e autoagregação bacteriana. Tafi foi identificada em *S. Enteritidis* por White et al. (2003) que denominaram seu operon de *agf* em 1991. Este gene está envolvido com o aumento da aderência e invasão às células eucarióticas (revisão de GIBSON et al. 2007).

Na prevalência dos operons fimbriais *Salmonella* - específicos, está incluído o *lpf* (*long polar fimbriae*), que regula a expressão de fímbria polar. Esta fímbria é mais longa do que as outras fímbrias elaboradas e polarmente localizada na célula bacteriana. O

gene *lpfA* codifica a maior subunidade da fímbria, sendo que os genes fimbriais *lpf* completos parecem estar presentes somente em algumas sorovares de *Salmonella* subespécie *entéricas* e *S. bongori*. Provavelmente a fímbria polar esteja envolvida no tropismo pelas placas de Peyer's em intestinos de ratos (BAÜMLER et al., 1998).

Apesar de estarem envolvidas na colonização das células alvo, as fímbrias não têm seu papel completamente compreendido na patogenicidade da *Salmonella* (VAN ASTEN & DIJK, 2005).

O presente trabalho teve o objetivo de avaliar a presença dos genes de virulência, *invA*, *agfA* e *lpfA*, em 45 amostras de *Salmonella* Hadar, isoladas a partir de materiais de origem avícola, pelo Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária – CDPA/UFRGS.

MATERIAL E MÉTODO

O trabalho em questão foi realizado no Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária (CDPA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), em Porto Alegre. Foram analisadas 45 amostras de *Salmonella* Hadar, isoladas a partir de mecônio, carcaças e cortes de frango no Rio Grande do Sul, previamente identificadas no Instituto Oswaldo Cruz e que estavam estocadas na bacterioteca do CDPA-UFRGS. As amostras estavam acondicionadas em Agar Estoque e após reativação em caldo BHI, foram passadas para o caldo Rappaport-Vassiliadis que foi colocado em banho-maria a 42°C por 24h. Após, as amostras foram estriadas em Agar Verde Brilhante (BGN) e incubadas novamente a 37°C por 24h, para isolamento das colônias. Então foram selecionadas de 3 a 5 colônias com características compatíveis com as de *Salmonella* e inoculadas em microtubos tipo *ependorf* contendo 1 ml de caldo BHI, sendo estes então incubados por 24h a 37°C. A extração do DNA foi realizada a partir desta alíquota de BHI contida nos *ependorfs*, e seguiu a técnica adaptada de Xuan Guo (2000), a qual é realizada a partir de centrifugações das alíquotas, seguidas de lavagem das mesmas e obtenção do DNA por lise das células bacterianas em banho-maria a 100°C. Os *mixes* utilizados nas três reações eram semelhantes e continham um volume total de 25 µL, compostos de 2,5 µL de solução tampão (10 X), 2 µL de dinucleotídios (2,5 mM), 1 µL de cada primer (20pmol), 0,2 µL de Taq polimerase (1 U), 1,25 µL MgCl₂ (2,5 mM), (para o gene *lpfA* a quantidade de MgCl₂ foi de 2 µL) e 2 µL do DNA previamente extraído.

Os protocolos para o termociclador também eram muito parecidos, neles as amostras eram submetidas à desnaturação inicial de 5 minutos a 94 °C, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 segundo, anelamento à 55°C (para o gene *agfA* a temperatura de anelamento foi de 58°C) por 1 segundo e extensão à 74°C por 21 segundos realizando-se uma extensão final à 72°C por 7 minutos. Os *primers* para cada gene utilizado nas reações estão descritos na tabela abaixo.

Tabela 1: *Primers* para os genes *invA*, *agfA* e *lpfA*.

| Gene | Primers |
|-------------------|---|
| <i>invA</i> 3' | F 5' GTG AAA TTA TCG CCA CGT TCG GGC AA |
| | R 5' TCA TCG CAC CGT CAA AGG AAC C 3' |
| <i>agfA</i> | F 5'TCC ACA ATG GGG CGG CGG CG 3' |
| | R 5'CCT GAC GCA CCA TTA CGC TG 3' |
| <i>lpfA</i> | F 5'CTT TCG CTG CTG AAT CTG GT 3' |
| | R 5'CAG TGT TAA CAG AAA CCA GT 3' |

Após a amplificação as amostras foram aplicadas em gel de agarose (1,2 %) com 20 % de brometo de etídeo, juntamente com um marcador de peso molecular. O gel foi submetido a eletroforese e posterior leitura em luz ultra violeta.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos nos testes mostram a presença dos três genes investigados em todas as amostras de *Salmonella* Hadar testadas, como pode ser verificado nas Figuras 1 a 3.



Figura 1: Imagem do gel de agarose. Bandas compatíveis com gene *invA* dos isolados de *S. Hadar* (284 pares de bases). Seta indicando banda de 300pb do marcador de peso molecular.

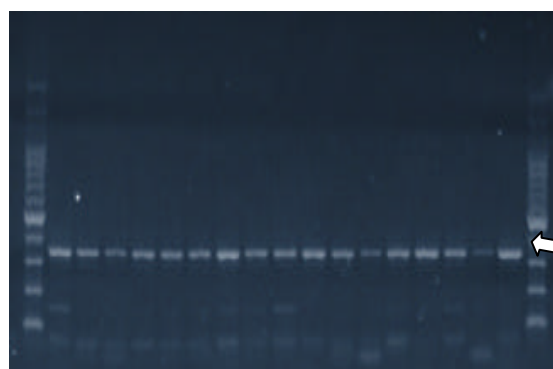


Figura 2: Imagem do gel de agarose. Bandas compatíveis com gene *agfA* dos isolados de *S. Hadar* (350 pares de bases). Seta indicando banda de 400pb do marcador de peso

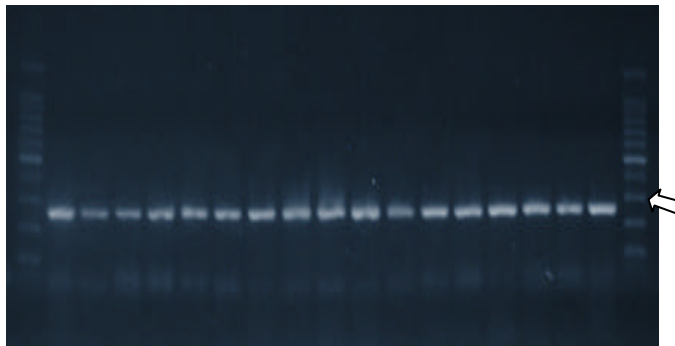


Figura 3: Imagem do gel de agarose. Bandas compatíveis com gene *lpfA* dos isolados de *S. Hadar* (250 pares de bases). Seta indicando banda de 300pb do marcador de peso molecular.

A *Salmonella* Hadar pertence ao grupo das salmonelas paratíficas ou zoonóticas, porém, diferente destas, *S. Hadar*, não é considerada, até o momento, pelo *European Union Zoonosis Council Directive 92/117/EEC*, um sorovar invasivo. No entanto, este sorovar já foi isolado de órgãos de aves (DESMIT et al., 1998) e, associando este fato aos resultados desse trabalho, pode-se sugerir que a mesma possui um potencial invasivo. É neste contexto que estudos do genótipo da *S. Hadar*, como o realizado neste trabalho, vêm a contribuir para a sua caracterização e maior entendimento da interação da mesma com o hospedeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CLARK, M.A.; HIRST, B.H.; JEPSON, M.A. Inoculum composition and *Salmonella* pathogenicity island 1 regulate M- cell invasion and epithelial destruction by *Salmonella typhimurium*. **Infection and Immunity**, v.66, n.2, p.724-731, 1998.

DESMIDT, M.; DUCATELLE, R.; HAESBROUCK, F. Serological and bacteriological observations on experimental infection with *Salmonella hadar* in chickens. **Veterinary Microbiology**, v.60, n.2-4, p.259-269, 1998.

DARWIN, K.H.; MILLER, V.L. Molecular Basis of the Interaction of *Salmonella* with the Intestinal Mucosa. **Clin. Microbiol. Rev.**, 12: 405-428, 1999.

ECHEITA, M. A.; HERRERA, S.; GARANIZAR, J. et al. Multiplex- PCR based detection and identification of most common *Salmonella* second-phase flagellar antigens. **Research in Microbiology**, v.153, p.107-113, 2002.

EUROSURVEILLANCE e- Alert. Over 2000 cases so far in *Salmonella* Hadar outbreak in Spain associated with consumption of pre-cooked chicken. Disponível em <URL: [http:// www.Salmonellablog.com/Archives/002275.html](http://www.Salmonellablog.com/Archives/002275.html) >Acesso: mar. 2006.

GALAN, J.E.; GINOCCHIO, C.; COSTEAS, P. Molecular and functional characterization of the *Salmonella* invasion gene *invA*: Homology of *InvA* to members of a new protein family. **Journal of Bacteriology**, v.174, n.13, p.4338-4349, 1992.

GIBSON, D.L., et al. AgfC and AgfE facilitate extracellular thin aggregative fimbriae synthesis in *Salmonella* Enteritidis. **Microbiology-Sgm**, v.153, p.1131-1140, 2007.

GUO, X.; CHEN, J.; BEUCHAT, L.R.; et al. PCR detection of *Salmonella enterica* serotype Montevideo in and on raw tomatoes using primers derived from *hliA*. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 5248-5252, 2000.

HERISKTAD, H.; MOTARJEMI, Y.; TAUXE, R.V. *Salmonella* surveillance: a global survey of public health serotyping. **Epidemiol. Infect.**, 129:1-8, 2002.

KONEMAN, E.W. **Color atlas and textbook of diagnostic microbiology**. 5 ed. Philadelphia: Lippincott, 1997. p. 500-530.

RODRIGUES, D. P. Ecologia e prevalência de *Salmonella* spp. em aves e material avícola no Brasil. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2005. Santos, SP. **Anais**. Campinas: FACTA, 2005. v. 2, p. 223-228.

TORTORA, G. J; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 6 ed. Porto Alegre, Artmed, 2000. p.83.

VAN ASTEN, A.J.A.M. & VAN DIJK, J.E. Distribution of "classic" virulence factors among *Salmonella* spp. **Fems Immunology and Medical Microbiology**, v.44, n.3, p.251-259, 2005.

WALLIS, T.S. & GALYOV, E.E. Molecular basis of *Salmonella*-induced enteritis. **Molecular Microbiology**, v.36, n.5, p.997-1005, 2000.