# Ferramentas para a identificação molecular de *Salmonella* em alimentos em laboratórios de pequeno a médio porte: uma breve revisão

Flávia Bülow dos Santos[1], Rosinete de Lima Maia[1], Rute Gonzalez Ribaya[1], Paulo Henrique Matayoshi Calixto[2]*

[1]Curso técnico em Biotecnologia, IFSC
[2] Instituto Federal de Santa Catarina
*Biomédico, Mestre e Doutor em Medicina Tropical e Infectologia

**Resumo** *Salmonella* é um patógeno, não raramente encontrado em alimentos de todas as origens. Existem aproximadamente 3.000 sorotipos reconhecidos dessa espécie, o que dificulta e muito seu diagnóstico e classificação assertiva. A classificação dos isolados de *Salmonella* é essencial para a vigilância epidemiológica. Contudo, devido às dificuldades de logística e de operação, o diagnóstico correto desses espécimes é comprometido, sendo que em alguns casos, sequer são realizados. Para superar essas limitações, foram elencadas técnicas moleculares para o diagnóstico e classificação de *Salmonella* que podem ser desenvolvidas em laboratórios de pequeno a médio porte, devido a necessidade de poucos equipamentos para a sua realização. Essas técnicas incluem a eletroforese em campo pulsado, análise do RNA ribossômico, análise do polimorfismo do DNA amplificado aleatoriamente, análise do polimorfismo do DNA amplificado aleatoriamente, amplificação de elementos repetitivos e polimorfismo do comprimento do fragmento de restrição do produto de PCR.

**Palavras-chave:** *Salmonella,* diagnóstico molecular, sorotipagem.

# Tools for molecular identification of Salmonella in food in small to medium-sized laboratories: a short review

**Abstract** *Salmonella* is a pathogen, not infrequently found in foods of all origins. There are approximately 3,000 recognized serotypes of this species, which makes diagnosis and assertive classification very difficult. The classification of *Salmonella* isolates is essential for epidemiological surveillance. However, due to logistical and operational difficulties, the correct diagnosis of these specimens is compromised, and in some cases, they are not even performed. To overcome these limitations, molecular techniques for the diagnosis and classification of *Salmonella* were listed, which can be developed in small to medium-sized laboratories, due to the need for little equipment to perform them. These techniques include pulsed-field gel electrophoresis, ribosomal RNA analysis, randomly amplified DNA polymorphism analysis, randomly amplified DNA polymorphism analysis, amplification of repetitive elements and restriction fragment length polymorphism of the PCR product.

Keywords: *Salmonella*, molecular diagnosis, serotyping.

## Introdução

Espécies do gênero *Salmonella* são um dos principais agentes causadores de doenças transmitidas por alimentos, sendo considerada uma ameaça à saúde pública, não apenas no Brasil, mas em todo o planeta (ABEBE et al., 2020). A infecção humana pela *Salmonella* recebe o nome de salmonelose humana. Além de humanos, a salmonelose pode ocorrer em outros mamíferos. Essa infecção apresenta alta taxa de morbidade e, caso não tratada, é potencialmente fatal. A incidência de casos de salmonelose já foi atribuída a diversos produtos alimentícios, tais como animais, aves e produtos frescos (OLAIMAT et al., 2020). Nesse sentido a ocorrência de *Salmonella* em produtos cárneos, alimentos secos e outros produtos alimentícios representam um grande desafio para a avaliação de risco, do ponto de vista da saúde pública (ENG et al., 2015). A contaminação de alimentos por *Salmonella* pode ocorrer em qualquer etapa da produção do alimento, incluindo durante a alimentação do animal (JONES, 2011).

Dada a importância para a saúde pública e a necessidade de diminuir a exposição à *Salmonella*, existe um interesse contínuo e crescente para o desenvolvimento de métodos de identificação e detecção que não apenas sejam rápidos, mas também tenham resolução de detecção aprimorada. A importância da diferenciação entre os quase 3.000 sorotipos de *Salmonella*, além da necessidade contínua de reduzir os tempos de detecção, tornou-se um dos principais objetos de estudos da Microbiologia, à medida que a incidência da salmonelose se mantém elevada (SARGEANT, et al., 2020).

Apesar dos grandes avanços que proporcionaram o desenvolvimento de melhores métodos de detecção e identificação de *Salmonella*, outras questões metodológicas associadas à caracterização podem ser desafiadoras. Diferentes matrizes alimentares podem apresentar dificuldades para a recuperação eficiente de bactérias e o subsequente isolamento de DNA para a detecção molecular. Outras complicações podem surgir quando há uma transferência de antimicrobianos, normalmente utilizados na criação de animais, na profilaxia das unidades de produção ou na conservação, para os diluentes e meios de recuperação de alimentos ou amostras de alimentos tratados. Isso pode levar a uma falsa diminuição potencial no número de células bacterianas viáveis e uma subestimação no nível de contaminação na amostra original (ABBO et al., 1993). Da mesma forma, alcançar uma amostragem representativa de alimentos a granel, como grãos, pode despender um grande esforço, pois a distribuição da *Salmonella* é pouco frequente e sua distribuição não é homogênea nesses alimentos. Nesse sentido, a superação desses gargalos continua sendo um dos principais propulsores para o desenvolvimento e aprimoramento dos métodos de detecção de *Salmonella* (RAHMAN et al., 2019).

Consequentemente, um sem número de avanços foram realizados no que ser refere aos métodos de detecção molecular. O advento e a aplicação do *Next generation sequencing* (NGS) no *Whole-genome sequencing* (WGS) mudou drasticamente a abordagem para a identificação de cepas específicas de *Salmonella*, bem como para a detecção e tipagem de sorotipos. Numerosas análises abrangentes e mais focadas nos últimos anos foram publicadas sobre diferentes aspectos da *Salmonella* e outros métodos de detecção de patógenos de origem alimentar, incluindo métodos que envolvem ou não o cultivo, e também abordagens imunológicas e moleculares (ZHANG et al., 2019; VAN DEN BERG, et al., 2019). Nesse sentido, esta revisão tem por objetivo indicar os principais métodos moleculares para a detecção e identificação de espécies de *Salmonella* em alimentos.

## Eletroforese em campo pulsado

Devido ao grande tamanho do cromossomo bacteriano, bem como sua propriedade circular, a separação do material genético é mais eficientemente realizada através da eletroforese em campo pulsado (ECP). Diferente da eletroforese convencional, onde a corrente passa unidirecional e continuamente entre os polos, na ECP, a corrente elétrica é emitida isoladamente em três direções, tornando a separação de grandes moléculas de DNA mais eficiente (DUDEK et al., 2019). A ECP é útil para a identificação de cepas de *Salmonella* por *fingerprint*, ideal para situações de surtos alimentares, sendo uma técnica extremamente barata para realizar (ZOU et al., 2012).

Numerosos estudos indicam a alta capacidade discriminatória da ECP no rastreamento de fontes de infecção por diferentes sorotipos de *Salmonella.* Contudo, a ECP apresenta algumas desvantagens. A principal, é que a preparação das amostras para a eletroforese é um processo demorado e trabalhoso. Uma outra desvantagem é que a sensibilidade da análise varia com o sorotipo analisado (ZAKARIA et al., 2020).

Além das questões apresentadas, a reprodutibilidade das análises de ECP é mantida através da padronização rigorosa dos protocolos de execução. Uma das formas de assegurar o controle da qualidade é a comparação interlaboratorial dos padrões de ECP. Essa padronização foi facilitada pela criação de uma rede de resultados, coordenado pelo *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), um órgão americano, que reúne e compartilha informações sobre os mais diversos perfis de *Salmonella* em ECP. Apesar de ter sido considerado o padrão ouro, no que se refere à identificação de *Salmonella*, esse tipo de análise tem sido considerado cada vez mais obsoleto, em virtude da padronização de outras técnicas de identificação molecular (KOZYREVA et al., 2016).

## Análise do RNA ribossômico

A identificação de *Salmonella* por intermédio da análise do RNA ribossômico (rRNA) apresenta elevados índices de sensibilidade e especificidade. Essa análise recebe o nome de ribotipagem e se baseia no polimorfismo do comprimento do fragmento de restrição (RFLP). A ribotipagem é capaz de agrupar diferentes perfis de restrição, chamado ribotipos, que podem corresponder a sorotipos específicos. A ribotipagem convencional envolve a clivagem do DNA genômico bacteriano com uma enzima de restrição, tendo os sítios de clivagem conservados dentro e fora do operon rRNA; essa etapa é seguida pela hibridização de fragmentos de DNA genômico separados eletroforeticamente com uma sonda de operon ribossomal (MENDONÇA et al., 2011).

Mesmo apresentando diversos passos para sua execução, a reprodutibilidade da ribotipagem foi demonstrada em diversos estudos e apontada como alta. Via de regra, a ribotipagem gera poucas bandas de DNA, entre 5 a 12 bandas, separadas por eletroforese convencional, facilitando a análise dos padrões de RFLP. Por outro lado, se apenas um número reduzido de bandas de RFLP for analisado, o poder de discriminação e, consequentemente, o de identificação de sorotipos, será reduzido, conduzindo a erros de diagnóstico. Essa questão se torna ainda mais sensível para aqueles isolados que apresentam sorotipos intimamente relacionados (EMELE et al., 2019).

## Análise do polimorfismo do DNA amplificado aleatoriamente

A análise do polimorfismo do DNA amplificado aleatoriamente (RAPD-PCR) se baseia na amplificação aleatória

de DNA do genoma bacteriano. A amplificação ocorre através da utilização de iniciadores de aproximadamente 10 oligômeros, que se associam ao DNA bacteriano em condições de baixa estringência. O poder discriminatório deste método é diretamente afetado pela escolha dos iniciadores e as condições da PCR, o que é considerado um complicador na reprodutibilidade (FERRI et al., 2016).

É importante ressaltar que mesmo pequenas mudanças nos reagentes ou nas condições de reação podem resultar em diferenças significativas nos padrões de bandas produzidos. Assim a identificação do sorotipo de *Salmonella* envolvido em surtos ou na contaminação de alimentos, se torna extremamente difícil, podendo gerar resultados inconclusivos (SHEKHAWAT et al., 2019).

**Amplificação de elementos repetitivos**

A PCR de elemento repetitivo (RepPCR) amplifica fragmentos de DNA genômico utilizando iniciadores, cuja sequência-alvo são repetições específicas de cada espécie de *Salmonela* ou de cada sorotipo. Para a sorotipagem *Salmonella,* três conjuntos de sequências repetitivas presentes no genoma têm sido utilizadas, são elas: i) REP, sequência palindrômica extragênica repetitiva; ii) ERIC, consenso intergênico repetitivo enterobacteriano; BOX, uma sequência repetitiva da região promotora (KAKABADZE et al., 2018). Essas sequências permitem discriminação, pois são geneticamente estáveis e variam com relação à localização cromossômica e número de cópias entre as cepas. Semelhante à análise do polimorfismo do DNA amplificado aleatoriamente, reprodutibilidade é um dos principais nós dessa técnica (ALI-SHIROOD, et al., 2016).

Como ocorre em outros métodos de tipagem molecular que são baseados em perfis de padrão de bandas em gel de agarose, a RepPCR encontrou dificuldade com a identificação de subtipos homólogos e polifiléticos. Além disso, embora a reprodutibilidade fosse um limitante em alguns estudos, o uso de *kits* comerciais melhorou consideravelmente a reprodutibilidade (RAFATIZOMORODI et al., 2017).

**Polimorfismo do comprimento do fragmento de restrição do produto de PCR**

O polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição de PCR (PCR-RFLP) se baseia na distribuição dos perfis de bandas obtidos através da digestão, por enzimas de restrição, de produtos de PCR, também denominados com *amplicon.* Para utilizar o PCR-RFLP como método de identificação dos diversos sorotipos de *Salmonella*, primeiramente se deve isolar uma sequência polimórfica, através do sequenciamento de DNA. Essa sequência polimórfica, após digestões simples ou combinadas, deve ser capaz de diferenciar isolados até o nível de subespécie (MATIASOVIC et al., 2020).

O fragmento-alvo, que apresenta os melhores resultados na identificação dos sorotipos de *Salmonella,* são os genes fliC e fljB, responsáveis pelos antígenos flagelares de fase 1 e 2, respectivamente (ACHAKZAI et al, 2017). Além da correta escolha do fragmento-alvo, é importante reforçar que o poder discriminatório e de identificação também depende da escolha da enzima de restrição, bem como da otimização da reação de digestão (MURGIA et al., 2016).

Embora o método do PCR-RFLP seja tecnicamente simples, seu desempenho e poder diagnóstico depende de uma variação, em dada região genômica, muito pequena. Dessa forma, essas condições podem afetar rigorosamente o poder de identificação e causar dificuldades de interpretação dos dados produzidos (ALBARNAZ et al., 2007).

## Conclusão

Um sem número de pesquisadores utilizaram ferramentas moleculares para identificar e/ou classificar espécies de *Salmonella*. Contudo, a complexidade e a diversidade dos sorotipos de *Salmonella* tornaram esta questão é um desafio notável. As tentativas até o momento têm focado na identificação dos sorotipos mais comuns associados à salmonelose humana. As ferramentas, aqui descritas, irão auxiliar os laboratórios na identificação e padronização dos testes de *Salmonella.* Por fim, essas informações auxiliarão laboratórios de pequeno a médio na identificação e classificação de espécimes de *Salmonella,* em especial, aqueles que não possuem uma estrutura operacional sofisticada, incluindo sequenciadores de DNA, disponíveis para tais análises.

## Referências bibliográficas

AABO, S. et al. Salmonella identification by the polymerase chain reaction. **Molecular and cellular probes**, v. 7, n. 3, p. 171-178, 1993.

ABEBE, Engidaw et al. Review on major food-borne zoonotic bacterial pathogens. **Journal of Tropical Medicine**, v. 2020, 2020.

ACHAKZAI, Safiullah Khan et al. Detection of Salmonella enterica serover Typhi from Widal-positive blood specimens by blood culture and PCR targeting aroC and fliC genes. **Rawal Medical Journal**, v. 42, n. 4, p. 475-478, 2017.

ALBARNAZ, Jonas D. et al. Relationship between the contamination of gulls (Larus dominicanus) and oysters (Crassostrea gigas) with Salmonella serovar Typhimurium by PCR-RFLP. **International journal of environmental health research**, v. 17, n. 2, p. 133-140, 2007.

ALI-SHIROODI, Abbas et al. Genotyping of Salmonella enterica serovar Enteritidis, isolated from human and animal by REP-PCR. 2016.

DUDEK, Bartłomiej et al. Comparison of the phylogenetic analysis of PFGE profiles and the characteristic of virulence genes in clinical and reptile associated Salmonella strains. **BMC veterinary research**, v. 15, n. 1, p. 312, 2019

ENG, Shu-Kee et al. Salmonella: a review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance. **Frontiers in Life Science**, v. 8, n. 3, p. 284-293, 2015.

FERRI, Francielli Mello et al. AVALIAÇÃO DA IDENTIFICAÇÃO DE SALMONELLA ENTERITIDIS DA CADEIA PRODUTIVA DE AVES COM BASE NA ANÁLISE DE POLIMORFISMO DE DNA POR RAPD. **Anuário Pesquisa e Extensão Unoesc Videira**, v. 1, p. e12444-e12444, 2016.

JONES, F. T. A review of practical Salmonella control measures in animal feed. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 20, n. 1, p. 102-113, 2011.

KAKABADZE, E. et al. Phage typing, antibiotic resistance and genomic rep-PCR fingerprinting of clinical Salmonella isolates from the Caucasus region. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 73, p. 148, 2018.

KOZYREVA, Varvara K. et al. Laboratory investigation of Salmonella enterica serovar Poona outbreak in California: comparison of pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and whole genome sequencing (WGS) results. **PLoS currents**, v. 8, 2016.

MATIASOVIC, Jan et al. Resolution of Streptococcus suis serotype 1/2 vs. 2 and 1 vs. 14 by PCR-RFLP method. **Journal of Clinical Microbiology**, 2020.

MENDONÇA, Eliane Pereira et al. Ribotipagem de Salmonella na cadeia

avícola–Revisão de literatura. **PUBVET**, v. 5, p. Art. 1043-1049, 2011.

MURGIA, Manuela et al. A novel broadly applicable PCR-RFLP method for rapid identification and subtyping of H58 Salmonella Typhi. **Journal of microbiological methods**, v. 127, p. 219-223, 2016.

OLAIMAT, Amin N. et al. Microbial safety of oily, low water activity food products: A review. **Food Microbiology**, p. 103571, 2020.

RAFATIZOMORODI, Abolfazl et al. Molecular typing of Salmonella isolates by REP PCR. In: **18th International and Iranian Congress of Microbiology**. 2017.

RAHMAN, Md Atikur et al. Isolation, identification and antibiotic sensitivity pattern of salmonella spp from locally isolated egg samples. **Am. J. Pure Appl. Sci**, v. 1, n. 1, p. 1-11, 2019.

SARGEANT, Jan et al. Salmonella in animal feeds: A scoping review protocol. 2020.

SHEKHAWAT, Surendra Singh et al. Random amplified polymorphic DNA-based molecular heterogeneity analysis of Salmonella enterica isolates from foods of animal origin. **Veterinary world**, v. 12, n. 1, p. 146, 2019.

VAN DEN BERG, Redmar R. et al. Characterization and whole genome sequencing of closely related multidrug-resistant Salmonella enterica serovar Heidelberg isolates from imported poultry meat in the Netherlands. **PLoS One**, v. 14, n. 7, p. e0219795, 2019.

ZAKARIA, Zunita et al. Analysis of Salmonella enterica serovar Enteritidis isolates from chickens and chicken meat products in Malaysia using PFGE, and MLST. **BMC Veterinary Research**, v. 16, n. 1, p. 1-8, 2020.

ZHANG, Shaokang et al. SeqSero2: rapid and improved Salmonella serotype determination using whole-genome sequencing data. **Applied and environmental microbiology**, v. 85, n. 23, 2019.

ZOU, Wen et al. Prediction system for rapid identification of Salmonella serotypes based on pulsed-field gel electrophoresis fingerprints. **Journal of clinical microbiology**, v. 50, n. 5, p. 1524-1532, 2012.