



QUANTIFICAÇÃO DE *Salmonella* sp. EM FEZES SUÍNAS POR PCR EM TEMPO REAL

DANIEL S. PAIM^{1*}, CAROLINA M. MALGARIN¹, JALUSA D. KICH²

¹Faculdade de Veterinária - FaVet/UFRGS - Porto Alegre/RS; ²Embrapa Suínos e Aves - Concórdia/SC - jalusa.kich@embrapa.br.

Resumo - *Salmonella* sp. é uma bactéria capaz de colonizar o trato gastro-intestinal dos seres humanos e animais. O suíno é uma importante fonte de infecção, pois elimina a bactéria de forma intermitente nas fezes contaminando o ambiente de criação e abate. Além disso, alguns animais podem excretar quantidades maiores desta bactéria, sendo considerados super-excretores. Desta forma, são necessárias técnicas de quantificação bacteriana para a identificação desses animais. Entre estas técnicas de PCR em tempo real se destaca devido sensibilidade e rapidez nos resultados. O objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de uma curva de quantificação de *Salmonella* sp. em fezes de suínos. Para tanto, fezes suínas foram contaminadas com inóculo de *Salmonella* sp. em diluições seriadas e incubadas em água peptonada tamponada por seis horas. Alíquotas de 1 mL foram retiradas para extração do DNA que foi padronizado a 10 ng/μL. A reação de qPCR foi realizada utilizando-se o sistema *SYBR Green*, com alvo no gene *Hill A*. A contagem na diluição 10⁻⁵ foi 1,1 x 10³ UFC/mL seguida de 14,33 x 10¹ UFC/mL e 2,67 x 10¹ UFC/mL para as diluições 10⁻⁴ e 10⁻³ respectivamente. As médias dos C_T obtidos nas 10 repetições variaram de 15,54 a 32,10. Os resultados das contagens foram associados aos respectivos C_T e foi possível obter uma curva de quantificação de *Salmonella* que poderá ser aplicada a identificação de suínos excretores.

Palavras-chave: Super-excretor; doença transmitida por alimento; curva de quantificação.

QUANTIFICATION OF *Salmonella* sp. IN SWINE STOOL BY REAL TIME PCR.

Abstract- *Salmonella* sp. is a bacterium capable of colonizing the gastro-intestinal tract of humans and animals. Swine is an important source of infection because it sheds the bacteria intermittently contaminating the production and slaughter environment. Furthermore, some animals can shed large amounts of the bacteria and are considered super-shedder. For this reason, bacterial quantification techniques are needed for the shedders identification. Among these techniques real time qPCR stands out due to sensitivity and short time consuming. The aim of this study was to develop a curve quantification of *Salmonella* sp. in swine stool. Therefore, swine stool samples were contaminated with *Salmonella* sp. inoculum in serial dilutions and incubated in buffered peptone water for six hours. Aliquots of 1 mL were taken for DNA extraction, it standardized to 10 ng/μL. The qPCR reaction was carried out using the *SYBR Green* system with target in *Hill A* gene. Counting 10⁻⁵ dilution was 1.1 x 10³ CFU/mL followed by 14.33 x 10¹ CFU/mL and 2.67 x 10¹ CFU/mL for the dilutions 10⁻⁴ and 10⁻³ respectively. The mean C_T obtained in 10 repetitions ranged from 15.54 to 32.10. The results of the counts were associated with respective C_T and it was possible to have a *Salmonella* quantification curve that can be applied to swine shedders identification.

Keywords: super-shedder; food borne disease; quantification curve.

Introdução – *Salmonella* sp. é uma bactéria Gram negativa, pertencente a família *Enterobacteriaceae*, capaz de colonizar o trato gastro-intestinal de seres humanos e animais. A infecção em humanos normalmente ocorre pela ingestão de alimentos contaminados por matéria fecal (PIGOTT, 2008). Este patógeno é amplamente distribuído na natureza e possui muitas oportunidades de ser introduzido na cadeia de produção de alimentos. *Salmonella* sp. é o principal micro-organismo causador de surtos de doença transmitida por alimentos (DTA) no Brasil, sendo a carne suína um dos alimentos envolvidos nestes surtos (SVS-MS, 2015). O suíno submetido ao estresse pré-abate, quando portador deste micro-



organismo, pode excretá-lo de forma intermitente, tornando-se uma importante fonte de contaminação para outros animais e para a linha de abate. Sabe-se que os suínos carreadores podem excretar entre 10^6 e 10^4 unidades formadoras de colônias (UFC) por grama de fezes de *Salmonella* sp. (GOPINATH, 2012). Estudos em camundongos demonstram que a excreção pode chegar a níveis entre 10^8 e 10^{10} UFC/g sendo esses considerados super-excretadores. Da mesma forma, o suíno pode desempenhar este papel de super-excretor no pré-abate, transmitindo a bactéria para o ambiente de processamento das carcaças. Em função disto, técnicas de quantificação bacteriana são ferramentas fundamentais para identificar os super-excretadores na população de animais. A reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) é uma destas técnicas, apresentando boa sensibilidade e rapidez nos resultados. O objetivo deste trabalho foi desenvolver uma curva de quantificação de *Salmonella* sp. em fezes de suínos através da técnica de qPCR.

Material e Métodos - Para obtenção da curva padrão foi produzido um inóculo de *Salmonella* sp. ajustado de acordo com a escala 5 de MacFarland, o qual foi quantificado por plaqueamento de diluições seriadas na base 10 em Ágar Tripton de Soja (TSA). Frascos contendo um grama de fezes provenientes de um suíno *Specific Pathogen Free* (SPF) foram contaminados com um mililitro de cada diluição do inóculo (oito diluições), adicionados nove mL de água peptonada tamponada e incubados em banho-maria a 37°C durante seis horas. Após o período de incubação, foi retirada uma alíquota de um mL para extração de DNA de cada diluição. Este processamento foi repetido 10 vezes. Para extração do DNA total foi utilizado um kit de extração comercial pelo método de *bead beating*, seguindo as orientações do fabricante. Após a extração, o DNA foi quantificado pelo método *Qubit* e padronizado para concentração 10 ng/ μl .

A reação de qPCR foi realizada utilizando-se o sistema *SYBR Green*, com alvo no gene *Hill A*, utilizando os seguintes primers: *F* CGCTGGCAGAATGCTACCTC; *R* AGCCCCAGTAATCCTAAAGCTTG. As condições de amplificação foram 95°C durante 10 min na etapa de pré-aquecimento seguido de 40 ciclos de 95°C durante 15 s e 62°C durante 30 s alternadamente. A etapa de leitura da curva de *Melting* foi programada com as seguintes temperaturas: 95°C durante 15 s, 58°C durante um min, 95°C durante 30 s e 58°C durante 15 s.

A curva de quantificação foi criada a partir das médias dos C_T obtidas nas 10 repetições associadas à contagem de UFCs do inóculo.

Resultados e Discussão – A tabela 1 apresenta os resultados das contagens do inóculo em UFC/ml e os valores de C_T (do inglês, *cycle threshold*), que representa o ponto de corte onde a fluorescência emitida caracteriza a amostra como positiva, obtidos com a reação de qPCR. Concentrações acima de 10^5 foram estimadas e não foi observado crescimento bacteriano na diluição 10^{-8} .

Tabela 1- Média das contagens do inóculo de *Salmonella* sp. e média dos C_T obtidos na qPCR de 10 repetições.

Diluição do inóculo	Contagem UFC/ml	Log n UFC/mL	Média C_T
10^0	$1,1 \times 10^{8*}$	8,04	15,54
10^{-1}	$1,1 \times 10^7*$	7,04	16,88
10^{-2}	$1,1 \times 10^6*$	6,04	18,91
10^{-3}	$1,1 \times 10^5*$	5,04	21,48
10^{-4}	$1,1 \times 10^4*$	4,04	24,45
10^{-5}	$1,1 \times 10^3$	3,04	27,51
10^{-6}	$14,33 \times 10^1$	2,16	30,51
10^{-7}	$2,67 \times 10^1$	1,43	31,27
10^{-8}	0	0	32,10

*Valores estimados.

A Figura 1 ilustra a amplificação obtida na qPCR de uma das repetições, onde é possível observar o aumento do C_T de acordo com o decréscimo da quantidade de *Salmonella* sp. obtida pela diluição seriada. Os resultados de UFC (log n) e o C_T médio das 10 repetições estão representados no gráfico



da Figura 2. Observa-se a linearidade destes resultados com os C_T aumentando conforme diminui a quantidade de *Salmonella* na amostra.

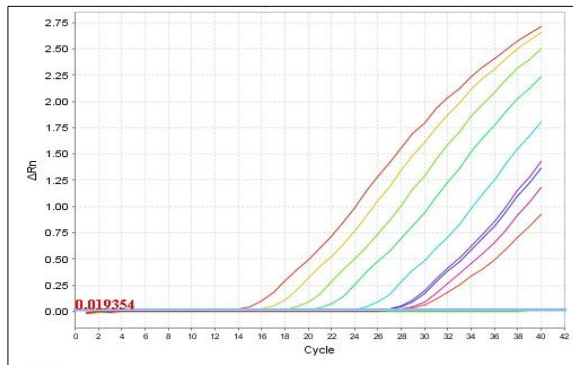


Figura 1. Gráfico de amplificação da qPCR em amostras de fezes inoculadas com quantidades conhecidas de *Salmonella sp.*, diluída na base 10.

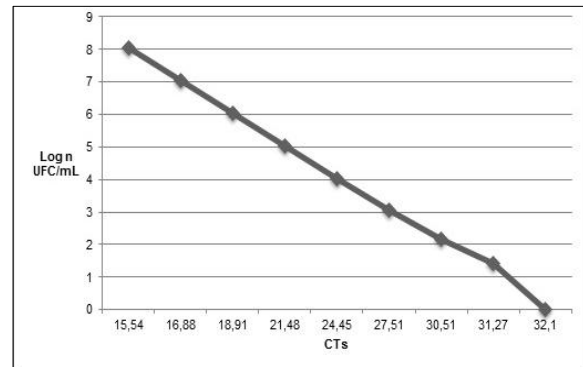


Figura 2. Curva de quantificação de *Salmonella sp.* em amostras de fezes inoculadas com quantidades conhecidas de *Salmonella sp.*, diluída na base 10 por qPCR.

Existe uma dificuldade natural na quantificação de bactérias por técnicas de PCR diretamente de amostras de fezes em função da complexidade desta matriz. Isto é decorrente da presença de fatores de inibição como proteínas, glicolipídios, DNases, polissacarídeos, entre outros (Monteiro et al, 1997). A quantificação direta em amostras de fezes sem nenhuma fase de enriquecimento foi testada anteriormente (dados não publicados) e a sensibilidade foi baixa. Malorny et al. (2008) propuseram a fase de enriquecimento não seletivo de 8 a 10hs para amostras de alimentos e ração. Neste trabalho, foi possível aumentar a sensibilidade da quantificação ($2,67 \times 10^1$) utilizando uma fase de enriquecimento não seletivo curto (seis horas), que possibilita a realização do teste no mesmo dia.

Conclusões – Foi possível obter uma curva de quantificação de *Salmonella* em fezes que poderá ser aplicada a identificação de suínos excretores.

Referências Bibliográficas

- GOPINATH, S.;CARDEN, S.;MONACK, D.; 2012. Shedding light on *Salmonella* carriers. **Trends in Microbiology**, Vol.20, No. 7, p. 320-327.
- MALORNY *et al.*; 2008. Applied and Environmental Microbiology. **Enumeration of Salmonella Bacteria in Food and Feed Samples by Real-Time PCR for Quantitative Microbial Risk Assessment**. Mar. p. 1299-1304.
- Monteiro, L. *et al*; 1997. Journal of Clinical microbiology. **Complex polysaccharides as PCR Inhibitors in Feces: Helicobacter pylori Model**. Apr. p. 995-998.
- PIGOTT, D.; 2008. Foodborne Illness. **Emergency Medicine Clinics of North America**, [S.l.] n. 26, p. 475-497.
- SVS, MS 2015. **Doenças Transmitidas por Alimentos**. Ministério da Saúde / Secretaria de Vigilância em Saúde (MS-SVS).