



**XXIV
Mostra
de Iniciação
Científica**

**SEMANA DO
CONHECIMENTO**

A Universidade em movimento

De **7a10** de outubro de 2014



**Universidade
de Passo Fundo**

RESUMO

Genes associados à virulência em Salmonella Enteritidis isoladas de surtos de doenças transmitidas por alimentos e de origem avícola

AUTOR PRINCIPAL:

Luísa Neukamp Diedrich

E-MAIL:

lundiedrich1@hotmail.com

TRABALHO VINCULADO À BOLSA DE IC::

Probic Fapergs

CO-AUTORES:

Luisa Neukamp Diedrich, Carla F. Silva, Bruna Webber, Sara S. Gehlen, Karen Apellanis Borges, Anderlise Borsoi, Eduardo Cesar Tondo, Vladimir Nascimento, Luciana Ruschel dos Santos, Rafael Frandoloso.

ORIENTADOR:

Laura Beatriz Rodrigues

ÁREA:

Ciências Agrárias

ÁREA DO CONHECIMENTO DO CNPQ:

Microbiologia de Alimentos

UNIVERSIDADE:

UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO

INTRODUÇÃO:

A Salmonella Enteritidis, comumente isolada de ovos e carne de frango, é o sorovar mais prevalente em surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) no Brasil e também no Rio Grande do Sul. Os mecanismos que esta bactéria usa para causar doença estão associados com a forma com que ela interage com seus hospedeiros e também por genes associados à virulência e a patogenicidade. Os microrganismos patogênicos distinguem-se de outros de mesma espécie ou sorovar por possuírem e expressarem genes que codificam fatores de virulência, que são fatores que propiciam a colonização e ocorrência de diversos eventos que subvertem a fisiologia hospedeira. Deste modo, o objetivo deste trabalho foi analisar, através da reação em cadeia pela polimerase (PCR), se 18 Salmonella Enteritidis isoladas de surtos de doenças transmitidas por alimentos e de origem avícola possuem os genes hilA, avrA, invA, sivH, sopE, spiA, agfA, lpfA, sefA e spvC.

METODOLOGIA:

Foram analisadas 18 amostras de Salmonella Enteritidis (5 de alimentos de origem avícola envolvidos em surtos, 5 de coprocultura de pacientes de DTA, 4 de cortes de aves destinados ao consumidor e não envolvidos em surtos, e 4 de swabs de arrasto de galpões de frango de corte) e a S. Enteritidis ATCC 13076. A extração do DNA foi feita por tratamento térmico (Borsoi et al., 2009). Foram pesquisados os genes: hilA, avrA, invA, sivH, sopE, spiA, agfA, lpfA, sefA, spvC (Tabela 1) por meio da técnica da reação em cadeia pela polimerase (PCR), (Borges et al., 2013). Como controle da reação foi utilizado uma amostra contendo os reagentes sem o DNA extraído, como controle positivo foi utilizada S. Enteritidis ATCC 13076 e o controle negativo Manheimia haemolytica ATCC 29694 para todos os genes. Os produtos da amplificação foram analisados por eletroforese em gel, com gel de agarose a 1,2% corado com brometo de etídio, e realizada a leitura em transiluminador de luz ultravioleta.

RESULTADOS E DISCUSSÕES:

Os genes hilA, avrA, invA, sopE, spiA, agfA, lpfA, sefA e spvC estiveram presentes em 100% das amostras, independente da sua origem, porém o gene sivH apareceu em 89% do total (Tabela 3 e 4). Este gene esteve ausente em 1 isolado de surto de DTA e 1 isolado de origem avícola não originada de surto (Tabela 2). O gene hilA é necessário para a colonização das bactérias no lúmen do intestino do hospedeiro (Murray e Lee, 2000) e codifica a secreção de proteínas relacionadas com a invasão celular (Cardona-Castro et al. 2002). A proteína avrA codificada pelo gene avrA é importante para o sistema de secreção garantindo que a infecção por certos sorovares permaneça localizada em local específico, como o trato gastrointestinal (Hardt e Gálan, 1997). Já o gene invA, é um gene conservado em todos os sorovares de Salmonella e possui como principal função a internalização da bactéria para invasão das células epiteliais (Oliveira et al., 2003). O gene sopE pode auxiliar na identificação de cepas com potencial para disseminação de epidemias devido às diferenças no seu potencial de invasão ao hospedeiro (Hopkins e Threlfall, 2004). O gene spiA se refere a virulência da S. Enteritidis e também formação de biofilme, pois quando este gene é eliminado, há deficiência na adesão de células bacterianas (Dong et al., 2011). O gene agfA tem como uma das principais funções promover a interação inicial da bactéria com o intestino do hospedeiro via fímbria (Sukupolvi et al., 1997). O gene lpfA está envolvido com a aderência da bactéria no intestino delgado, especialmente às placas de Peyer do íleo, principal porta de entrada do agente (Bäumler et al., 1996). Já o gene sefA é estrito ao sorovar S. Enteritidis e codifica proteínas componentes de fímbria e adesinas (Borges, 2013). O gene spvC está relacionado com a taxa de crescimento de Salmonella spp. nas células do hospedeiro e assim, interferindo com o sistema imune (Swamy et al., 1996).

CONCLUSÃO:

O perfil genético das Salmonella Enteritidis analisadas mais prevalente foi o perfil 1. Pode-se verificar que as amostras testadas possuem genes codificadores de fatores de virulência, das quais propiciam a colonização e patogenia no hospedeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- Borges et al. Pesq. Vet. Bras., 2013
Borsoi, Poul. Scie., 2009
Cardona-Castro et al. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 2002
Dong et al. Microbio., 2011
Hardt e Gálan. Procee. Nat. Acad. Science, 1997
Hopkins e Threlfall. J. Med. Microbio., 2004
Malorni et al. Applied na Envir. Microbio., 2003
Murray e Lee. Infect. Immun, 2000
Oliveira et al. Braz. J. Microbio, 2003
Sukupolvi et al. Infec. and Immuni., 1997
Swamy et al. Appl. Environ. Microbio, 1996

Tabela 1: Sequência de primers utilizados na pesquisa de genes associados à virulência de *Salmonella* Enteritidis isoladas de surtos de doenças transmitidas por alimentos e de origem avícola.

Gene alvo	Sequência de primer (5' - 3')	pb	Referências
hlyA	? CTGCCGAGTGTTAAGGATA	497	Guo et al. 2000
	CTGTCGCCTTAATCGCATGT?		
avrA	? GTTATGGACGGAAACGACATCGG	385	Prager et al. 2003
	ATTCTGCTCCCGCCGCC?		
invA	? GTGAAATTATCGCCACGTTCCGGCAA	284	Oliveira et al. 2002
	TCATCGCACCGTCAAAGGAACC?		
stxH	? CAGAAATGCGAATCCTTCGCAC	763	Kingsley et al. 2003
	GTATGCGAACAAGCGTAACAC?		
sopE	? ACACACTTTCACCGAGGAAGCG	398	Prager et al. 2003
	GGATGCCTTCTGATGTTGACTGG?		
spiA	? CCAGGGGTCGTTAGTGTATTGCGTGAGATG	550	Skyberg et al. 2006
	CGCGTAACAAAGAACCCGTAGTGATGGATT?		
agfA	? TCCACAATGGGCGGCGGCG	350	Cesco et al. 2008
	CCTGACGCACCATACGCTG?		
lpfA	? CTTTCGCTGCTGAATCTGGT	250	Bäumler & Heffron 1995
	CAGTGTTAACAGAAACCACT?		
sefA	? GATACTGCTGAACGTAGAAGG	488	Oliveira et al. 2002
	GCGTAAATCAGCATCTGCAGTAGC?		
spvC	? CGGAAATACCATCTACAAATA	669	Swamy et al. 1996
	CCCAAACCCATACTTACTCTG?		

Tabela 2: Genes de virulência presentes e perfil genético de *Salmonella* Enteritidis isoladas de surtos de doenças transmitidas por alimentos e de origem avícola.

Amostra	Origem	Genes presentes	Perfil genético
SE09	Fezes (Surto)	hlyA; avrA; invA; stxH; sopE; spiA; agfA; lpfA; sefA; spvC	P1
SE10	Fezes (Surto)	hlyA; avrA; invA; stxH; sopE; spiA; agfA; lpfA; sefA; spvC	P1
SE24	Fezes (Surto)	hlyA; avrA; invA; stxH; sopE; spiA; agfA; lpfA; sefA; spvC	P1
SE29	Fezes (Surto)	hlyA; avrA; invA; stxH; sopE; spiA; agfA; lpfA; sefA; spvC	P1
SE36	Fezes (Surto)	hlyA; avrA; invA; stxH; sopE; spiA; agfA; lpfA; sefA; spvC	P1
SE41	Fezes (Surto)	hlyA; avrA; invA; stxH; sopE; spiA; agfA; lpfA; sefA; spvC	P1
SE59	Fezes (Surto)	hlyA; avrA; invA; stxH; sopE; spiA; agfA; lpfA; sefA; spvC	P1
SE65	Maionese (Surto)	hlyA; avrA; invA; stxH; sopE; spiA; agfA; lpfA; sefA; spvC	P1
SE72	Maionese de mandioca (Surto)	hlyA; avrA; invA; stxH; sopE; spiA; agfA; lpfA; sefA; spvC	P1
SE75	Maionese de batata (Surto)	hlyA; avrA; invA; sopE; spiA; agfA; lpfA; sefA; spvC	P2
SE82	Asa de frango (Avícola)	hlyA; avrA; invA; stxH; sopE; spiA; agfA; lpfA; sefA; spvC	P1
SE84	Peito de frango (Avícola)	hlyA; avrA; invA; sopE; spiA; agfA; lpfA; sefA; spvC	P2
SE88	Dorso (Avícola)	hlyA; avrA; invA; stxH; sopE; spiA; agfA; lpfA; sefA; spvC	P1
SE90	Dorso (Avícola)	hlyA; avrA; invA; stxH; sopE; spiA; agfA; lpfA; sefA; spvC	P1
SE111	Suabe de arrasto (Avícola)	hlyA; avrA; invA; stxH; sopE; spiA; agfA; lpfA; sefA; spvC	P1
SE114	Suabe de arrasto (Avícola)	hlyA; avrA; invA; stxH; sopE; spiA; agfA; lpfA; sefA; spvC	P1
SE163	Suabe de arrasto (Avícola)	hlyA; avrA; invA; stxH; sopE; spiA; agfA; lpfA; sefA; spvC	P1
SE170	Suabe de arrasto (Avícola)	hlyA; avrA; invA; stxH; sopE; spiA; agfA; lpfA; sefA; spvC	P1

Tabela 3: Perfil genético das *Salmonella* Enteritidis isoladas de surtos de doenças transmitidas por alimentos e de origem avícola.

Perfil Genético	Número de amostras	Genes									
		hlyA	avrA	invA	stxH	sopE	spiA	agfA	lpfA	sefA	spvC
P1	16	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P2	2	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+

Tabela 4: Frequência de detecção dos genes associados à virulência de *Salmonella* Enteritidis isoladas de surtos de doenças transmitidas por alimentos e de origem avícola.

Gene	Amostras positivas	
	Total (n=18)	Total (%)
hlyA	18	100
avrA	18	100
invA	18	100
stxH	16	89
sopE	18	100
spiA	18	100
agfA	18	100
lpfA	18	100
sefA	18	100
spvC	18	100

Assinatura do aluno

Assinatura do orientador