

COMPARAÇÃO DE MÉTODOS PARA EXTRAÇÃO DE DNA NA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE PARA DETECÇÃO DE *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis EM PRODUTOS AVÍCOLAS

RAPHAEL LUCIO ANDREATTI FILHO,¹ GUILHERME AUGUSTO MARIETTO GONÇALVES,²
ADRIANO SAKAI OKAMOTO³ E EDNA TERESA DE LIMA⁴

-
1. Professor Adjunto do Departamento de Clínica Veterinária da FMVZ/UNESP, Botucatu, SP
2. Doutorando em Ornitopatologia pelo Departamento de Clínica Veterinária da FMVZ/UNESP, Botucatu, SP. E-mail: gmrietto_ornito@fmvz.unesp.br
3. Professor Assistente do Departamento de Clínica Veterinária da FMVZ/UNESP, Botucatu, SP
4. Professora Assistente do Curso de Medicina Veterinária da UFPR, Palotina, PR.

RESUMO

A identificação de *Salmonella* spp. em amostras de alimentos por diagnóstico microbiológico é demorada, com aproximadamente cinco diferentes etapas, levando cerca de 120 horas até o resultado final. A utilização da técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) pode diminuir esse período; entretanto, substâncias presentes nas amostras podem afetar a reação. O objetivo deste trabalho foi comparar a extração de DNA de *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis (SE), por tratamento térmico e pelo uso do *cetyltrimethyl ammonium bromide* (CTAB), em produtos provenientes de granjas avícolas, correspondentes a matéria prima (farinha de carne) e a suabes de arrasto experimentalmente

contaminados. As amostras de DNA obtidas com as extrações foram submetidas a PCR, utilizando-se um par de oligonucleotídeos iniciadores para amplificação de DNA do gene específico de SE – *Sdf* 1. Comparando-se os métodos de extração, observou-se que quando do uso do CTAB detectou-se SE em 70% de matéria prima e em 80% de suabes de arrasto, enquanto com o método por tratamento térmico houve positividade em 20% de matéria prima e em 40% de suabes de arrasto. Houve detecção de SE em ambos os métodos utilizados para extração de DNA, porém, o uso de CTAB detectou maior número de amostras positivas, quando comparado com o tratamento térmico.

PALAVRAS-CHAVES: PCR, *Salmonella* Enteritidis, ave, extração de DNA, CTAB.

ABSTRACT

COMPARISON OF DNA EXTRACTION METHODS IN POLYMERASE CHAIN REACTION FOR THE DETECTION OF *Salmonella enterica* SEROVAR ENTERITIDIS IN POULTRY PRODUCTS

The identification of *Salmonella* spp. in food samples by microbiological diagnosis is time consuming, with approximately five different stages, requiring about 120 hours until the final result. The utilization of the polymerase chain reaction technique (PCR) can reduce this time, but substances present in samples may affect the reaction. The present work aimed to compare DNA extraction by thermic treatment and by the use of *cetyltrimethyl ammonium bromide* (CTAB), in products originated from poultry houses corresponding to raw material (meat meal) and experimentally

contaminated drag swabs. Materials obtained from the extractions were submitted to PCR, utilizing a pair of initiator oligonucleotides for amplification of *Sdf* 1 gene fragments. Comparing the methods of extraction, it was observed that when CTAB was employed, SE was detected in 70% of meat meal and in 80% of drag swabs, while the thermic treatment method yielded positive results in 20% of meat meal and in 40% of drag swabs. SE was detected under both methods utilized for DNA extraction, but the use of CTAB detected a greater number of positive samples, compared with thermal treatment.

KEYWORDS: PCR, *Salmonella* Enteritidis, chicken, DNA extraction, CTAB.

INTRODUÇÃO

Com a grande expansão da indústria avícola, a salmonelose tornou-se fator limitante na criação de aves, adquirindo importância relevante, pois as perdas econômicas estão presentes em todas as fases da criação, ou seja, da produção ao consumo dos produtos de origem avícola (BARROW, 1993). Desta forma, a salmonelose representa uma severa barreira sanitária e restringe o comércio de aves e seus produtos em todo o mundo (BERCHIERI JÚNIOR & BARROW, 1995).

Os sorotipos de maior importância em saúde pública são Typhimurium e Enteritidis, ambos de difícil controle, em função da complexidade de suas epidemiologias que, envolvem grande número de reservatórios após a excreção fecal e contaminação ambiental. Um programa de controle e monitoramento bem administrado pode proporcionar melhorias no controle da *Salmonella* spp., em produtos de origem animal (FLORES et al., 2001).

Os métodos microbiológicos são largamente empregados para detecção da *Salmonella* spp., embora o sucesso no controle das infecções seja dependente do tempo e da precisão dos testes diagnósticos. Por isso, novas técnicas de diagnóstico têm sido desenvolvidas, destacando-se a reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizada com êxito para detecção de vários microrganismos (GAST, 1997).

RAHN et al. (1992), usando um par de oligonucleotídeos de gene *InvA*, detectaram com sucesso 626 cepas de *Salmonella* spp. em 360 amostras testadas, a partir de uma colônia isolada e incorporada direto na PCR. Os autores obtiveram sensibilidade de 99,4% e especificidade de 100%, pois não se observou reação positiva em controle negativo algum pertencente a outras 33 enterobactérias testadas.

Segundo KONGMUANG et al. (1994), o custo de cada método de extração de DNA é também uma preocupação. Tanto partículas como substâncias solúveis são parcialmente removidas por centrifugação de baixa e alta velocidade. Entretanto, algumas bactérias poderiam ser perdidas no processo; além do mais, deve-se considerar a permanência de certas substâncias que podem interferir na PCR, levando à diminuição da sensibilidade da técnica.

Objetivou-se, com este trabalho, comparar a extração de DNA por tratamento térmico e pelo uso

de *cetyltrimethyl ammonium bromide* (CTAB) na PCR para detecção de *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis em produtos provenientes de granjas avícolas, correspondentes a matéria prima (farinha de carne) e a suabes de arrasto experimentalmente contaminados.

MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi realizada em produtos avícolas correspondentes a matéria prima (farinha de carne) e a suabes de arrasto contaminados experimentalmente com SE fagotipo 28. A bactéria foi cultivada em caldo BHI (caldo infusão cérebro coração) por 24 horas a 37°C, obtendo-se, após contagem em diluição decimal, 10⁸ unidades formadoras de colônia (UFC) por mL. Porções de 25 g da matéria prima (cinquenta amostras) foram transferidas individualmente para 225 mL de água peptonada. A esses conteúdos adicionou-se 1,0 mL do cultivo de SE. Após a contaminação artificial, as amostras foram homogeneizadas e incubadas a 40 °C por 24 horas. Os suabes de arrasto (cinquenta amostras) foram incubados em 225 mL de água peptonada, a 40 °C, por 24 horas, acrescidos de 1,0 mL do cultivo de SE.

As metodologias utilizadas para extração do DNA foram por tratamento térmico e uso do CTAB. Para o tratamento térmico centrifugou-se cada uma das amostras após a contaminação artificial a 10.000 rpm por cinco minutos, em temperatura ambiente, sendo o sobrenadante desprezado e 1,0 mL de tampão TE (10 mM Tris-HCL, 1 mM EDTA) pH 8,0, acrescido ao *pellet*. O produto foi agitado em vortex, com posterior aquecimento a 95 °C por dez minutos, e centrifugado a 10.000 rpm por três minutos, a 4 °C. Manteve-se o sobrenadante à temperatura de -20 °C, para posterior utilização na PCR (OLIVEIRA 2002).

O protocolo de extração do DNA utilizando CTAB foi realizado segundo OLIVEIRA (2002). Ao microtubo que continha 250 µL de cada uma das amostras, após a contaminação artificial, foram adicionados 100 µL de cloreto de sódio (NaCl) 5 M e 100 µL de CTAB pré-aquecido a 65 °C. A suspensão foi agitada por dez segundos até obter-se aspecto leitoso, com posterior incubação a 65 °C por dez minutos. Após esse período adicionaram-se 750 µL de clorofórmio-álcool-isoamílico (24:1), agitando-se por dez segundos com movimentos leves e em seguida

centrifugando-se em temperatura ambiente por cinco minutos, a 16.000 rpm.

O sobrenadante foi transferido para novo tubo e adicionaram-se 450 µL de etanol absoluto a -20 °C, incubando-se durante dez minutos a -20 °C. Em seguida foi centrifugado durante vinte minutos a 16.000 rpm, a 4 °C, eliminando-se o álcool e acrescentando-se 500 µL de etanol a 70% em temperatura ambiente, seguindo-se o mesmo procedimento de centrifugação anteriormente citado. O álcool foi eliminado novamente e o microtubo contendo o *pellet* foi submetido a secagem a 56 °C no banho seco (Termolyne). Após a completa secagem do *pellet*, adicionaram-se 50 µL de tampão de diluição (10 mM Tris-HCL, 1 mM EDTA) pH 8,0 previamente aquecido a 56 °C. As amostras de DNA foram mantidas em temperatura ambiente por vinte minutos e posteriormente armazenadas à temperatura de -20 °C até sua utilização na PCR.

O par de oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação do DNA foi sintetizado com base nas sequências 5' TGT GTT TTA TCT GAT GCA AGA GG 3' (*primer 1*) e 5' CGT TCT TCT GGT ACT TAC GAT GAC 3' (*primer 2*) para o gene específico de *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis - *Sdf 1* citado por AGRON et al. (2001).

A PCR foi realizada em termociclador (Eppendorf AG Mastercycler Gradient) com volume final de 100 µL. Foram depositados nos microtubos 10 µL de tampão para PCR 10x, 1 µL de cloreto de magnésio (MgCl₂), 5 µL de cada um dos oligonucleotídeos (40 nmol), 0,5 µL DNA Taq polimerase (1U), 2 µL de cada dNTP (2,5 mM), 65,50 µL, água ultrapura e 10 µL de DNA da amostra de *Salmonella*. Obedeceram-se aos seguintes ciclos: 94 °C por um minuto para desnaturação inicial, 27 ciclos de 94 °C por trinta segundos, 58 °C por trinta segundos, 72 °C por um minuto e um ciclo de extensão final de sete minutos a 72 °C. Os produtos da PCR foram analisados em gel de agarose a 1,5%, contendo brometo de etídio. Como marcador de peso molecular, utilizou-se DNA *ladder* 100 pb e a visualização foi realizada em transiluminador.

Os resultados foram analisados estatisticamente pelo teste do Qui-quadrado, comparando-se os resultados positivos e negativos em ambos os métodos de extração (ZAR, 1984).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os métodos para extração do DNA utilizados neste estudo propiciaram a identificação de SE (Figura 1), porém a metodologia com o uso de CTAB detectou maior número de amostras positivas, em relação ao método por tratamento térmico (Tabela 1). A detecção de SE utilizando-se CTAB foi significativamente diferente do método térmico nos dois materiais avícolas testados. Tanto na farinha de carne quanto nos suabes de arrasto, o uso do CTAB determinou 50% e 40% a mais de amostras positivas, respectivamente, quando comparado com o método térmico, sugerindo que a falha na identificação de SE em amostras positivas com o uso deste método poderia determinar prejuízos significativos ao estabelecimento avícola.



FIGURA 1. Eletroforese em gel de agarose dos produtos amplificados com *primers* para *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis. Marcador de 100 pb DNA *ladder* (coluna 1), produto amplificado de suabe de arrasto com o uso de CTAB (2) e tratamento térmico (3).

Ao utilizar a técnica de RAPD-PCR, TREVANICH et al. (2010) obtiveram resultados semelhantes aos do presente trabalho, quando comparadas as técnicas de CTAB e tratamento térmico. Além de maior sensibilidade na hora da extração de DNA, como observado neste estudo, houve também redução significativa no tempo de detecção.

FLORES et al. (2001), utilizando os métodos por fenol-clorofórmio e tratamento térmico, demonstraram resultados significativos a favor da metodologia por fenol-clorofórmio na detecção da *Salmonella* em ovos. LAGATOLLA et al. (1996), ao realizar PCR para detectar *Salmonella* proveniente de diferentes materiais

clínicos, compararam também os métodos por fenol-clorofórmio e tratamento térmico para extração de

DNA, não observando diferença significativa entre as metodologias testadas.

TABELA 1. Comparação dos métodos de extração de DNA na detecção de *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis em farinha de carne e suabe de arrasto pela técnica da PCR

Resultado	Farinha de carne		Suabe de arrasto	
	Tratamento térmico	CTAB	Tratamento térmico	CTAB
Positivo	10 (20%) ^A	35 (70%) ^B	20 (40%) ^A	40 (80%) ^B
Negativo	40 (80%)	15 (30%)	30 (60%)	10 (20%)
Total de amostras	50	50	50	50

^{A-B} Valores na mesma linha com letras distintas são significativamente diferentes ($P < 0,05$), no nível de 5% de significância.

Dois métodos de extração de DNA bacteriano presente em alimentos foram testados por DICKINSON et al. (1995). O primeiro utilizou tampão com proteinase K para lisar rapidamente as células e solubilizar as amostras. O segundo foi realizado com tolueno e mutanolisina para lise celular e solubilização com tiocinato de guanidina. Em ambos, o DNA foi precipitado com isopropanol, determinando resultados semelhantes entre os métodos de extração testados.

Ao comparar a qualidade do produto extraído e amplificado por nested-PCR em gel de sacarose, SIMIONATTO et al. (2005) verificaram que o produto obtido por CTAB apresentava qualidade de nitidez (sem a formação de bandas inespecíficas) superior à do obtido pelo método com dodecil sulfato de sódio, e qualidade semelhante à do produto extraído pelo método de fenol-clorofórmio, porém com menos intensidade comparando-se com o método de extração com tiocinato de guanidina.

Ao estabelecer um programa de monitoramento para *Salmonella*, a indústria avícola procura reduzir as perdas econômicas e a disseminação do agente, garantindo assim melhor qualidade microbiológica de seus produtos. A realização da PCR em produtos avícolas tem sido possível, mas determinados procedimentos de extração de DNA podem incrementar sua eficácia, uma vez que elevadas concentrações de proteínas, cálcio e sais biliares, entre outros, presentes nas amostras, poderiam reduzir a eficiência do método utilizado.

CONCLUSÃO

Os dois métodos de extração de DNA na PCR utilizados neste trabalho, tanto em farinha de carne quanto em suabes de arrasto experimentalmente contaminados, foram úteis para detecção de SE. O método de CTAB apresentou maior sensibilidade que o método por tratamento térmico, sendo, então, o seu uso mais aconselhável na implantação em rotina laboratorial ou pesquisa.

REFERÊNCIAS

- AGRON, P. G.; WALKER, R. L.; KINDE, H.; SAWYER, S. J.; HAYES, D. C.; WOLLARD, J.; ANDERSEN, G. L. Identification by subtractive hybridization of sequences specific for *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 4.984-4.991, 2001.
- BARROW P. A. *Salmonella*: present, past and future. **Avian Pathology**, v. 22, p. 651-669, 1993.
- BERCHIERI JR. A.; BARROW, P. A. Patologia e métodos de diagnóstico de *Salmonella* Enteritidis. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLA, 1995, Curitiba. **Anais...** Curitiba: Facta, 1995. p. 14-19. Disponível em: <http://www.facta.org.br/site/index.php/portal/publicacao/13>. Acesso em: fevereiro 2008
- DICKINSON, J. H.; KROLL, R. G.; GRANT, K. A. The direct application of polymerase chain reaction to DNA extracted from foods. **Letters in Applied Microbiology**, v. 20, p. 212-216, 1995.
- FLORES, M. L.; NASCIMENTO, V. P.; KADER, I. I. T. A.;

- SANTOS, K. L. R.; PONTES, A. P.; SALLE, C. T. P.; LOPES, R. F. F. Métodos de extração de DNA para detecção de *Salmonella* em ovos de galinhas, com e sem casca, através da reação em cadeia da polimerase. **Ciência Rural**, v. 31, p. 317-318, 2001.
- GAST, R. K. Paratyphoid infections. In: CALNEK, B. W.; BARNES, H.J.; BEARD, C.W.; McDOUGALD, L.R.; SAIF, Y.M. (Eds.). **Diseases of poultry**. 10. ed. Ames: State University Press, 1997. p. 97-121.
- KONGMUANG, U.; LUK, J. M. C.; LINDBERG, A. A. Comparison of three stool processing methods for detection of *Salmonella* serogroups B, C2 and D by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, p. 3.072-3.074, 1994.
- LAGATOLLA, C.; DOLZANI, L.; TONIN, E. PCR ribotyping for characterizing salmonella isolates of different serotypes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, p. 2.440-2.443, 1996.
- OLIVEIRA, D. E. **Infecção pelo vírus de Epstein-Barr (EBV) e vírus do papiloma humano (HPV), expressão da proteína p53 e proliferação celular em carcinomas de nasofaringe e laringe**. 2002. 117 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2002. Disponível em: <http://www.athena.biblioteca.unesp.br/exlibris/bd/bbo/33004064056P5/2002/oliveira_de_dr_botfm_prot.pdf>. Acesso em: março 2008
- RAHN, K.; de GRANDIS, S. A.; CLARKE, R. C.; McEWE, S. A.; GALÁN, J. E.; GINOCCHIO, C.; CURTIS, R.; GYLES, C. L. Amplification of invA gene sequence of *Salmonella* Typhimurium by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*. **Molecular and Cellular Probes**, v. 6, p. 271-279, 1992.
- SIMIONATTO, S.; LIMA-ROSA, C. A. V.; LIBRELOTTO, R. L.; CANAL, C. W. Um protocolo de “nested-PCR” para detecção do vírus da anemia das galinhas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 25, n. 2, p. 106-110, 2005.
- TREVANICH, S.; TIYAPONGPATTANA, S.; MIYAMOTO, T. Application of an optimized 18-h method involving one step culturing and single primer-based PCR assay for detection of *Salmonella* spp. in foods. **Food Control**, v. 21, n. 5, p. 593-598, 2010.
- ZAR, J. **Biostatistical analysis**. 2. ed. Englewood Cliffs, NJ: Prentice-Hall, 1984. p. 348-351.

Protocolado em: 7 abr. 2008. Aceito em: 29 nov. 2010.