

MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE DNA PARA A DETECÇÃO DE *Salmonella* EM OVOS DE GALINHAS, COM E SEM CASCA, ATRAVÉS DA REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE¹

DNA EXTRACTION METHODS FOR *Salmonella* DETECTION IN CHICKEN EGGS, IN SHELL AND OUTSHELL, BY POLIMERASE CHAIN REACTION

Maristela Lovato Flôres² Vladimir Pinheiro do Nascimento³ Ivonyr Irene Troglio Abdel Kader⁴
Luciana Ruschel dos Santos⁵ Alexandre Pontes Pontes⁵ Carlos Tadeu Pippi Salle³
Rui Fernando Felix Lopes³

RESUMO

O diagnóstico microbiológico de *Salmonella* sp em amostras de alimentos é demorado, com cinco diferentes etapas, levando cerca de 120 horas até o resultado final. A utilização da técnica da Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) pode diminuir esse período, porém sofre influência de substâncias presentes na amostra que afetam a reação. O objetivo deste trabalho foi comparar dois métodos de extração de DNA, a extração por tratamento térmico e a pelo fenol-clorofórmio, em amostras de 100 ovos de galinhas domésticas artificialmente contaminados com uma cepa de *Salmonella enterica* sorovar *typhimurium* em fase estacionária. O material obtido com as extrações foi submetido à PCR, utilizando-se um par de iniciadores que amplificam um fragmento de 284pb do gene *InvA* de *Salmonella* sp. Comparando os métodos de extração, observou-se uma diferença na capacidade de detecção de 12% a favor do método do fenol-clorofórmio, quando a extração foi realizada a partir do ovo com casca. No momento em que a mesma metodologia foi usada apenas com a parte interna dos ovos, essa diferença subiu para 26% o que foi significativo ($P < 0,003$), demonstrando que a metodologia de extração foi determinante para melhorar a sensibilidade da técnica. No entanto, ao comparar-se a percentagem de positivos independente da técnica de extração do DNA, observou-se diferença significativa ($P < 0,047$) a favor das amostras de ovos sem casca. Isso sugere que para a detecção de *Salmonella* por PCR deve-se utilizar apenas a parte interna dos ovos, pois a casca pode determinar interferência na técnica.

Palavras-chave: *Salmonella*, ovos, extração, DNA, PCR.

SUMMARY

The *Salmonella* sp detection in feed samples is time consuming, it has five stages and requires 120 hours for final

results. The use of polimerase chain reaction technique can reduce this time considerably, however it can be affected by substances from the sample. This study had the objective of comparing two methods of DNA extraction, by heating process and by phenol-chloroform in samples of 100 chicken eggs experimentally infected with a sample of *Salmonella enterica* sorovar *typhimurium* in stationary phase. After the two extraction methods a PCR was done using a pair of oligonucleotides that amplifies a fragment of 284pb in the *InvA* gene of *Salmonella* sp. Comparing the extraction methods it was noted a difference of 12% favorably to the phenol-chloroform method when the extraction was done from eggs with shell. The same method using just the egg internal part resulted in a difference of 26% with high significance ($P < 0,003$), showing that the method used was determinant to improve the technique efficiency. However, comparing the positive percentage independent of the DNA extraction method a significant difference ($P < 0,047$) was noted for outshell eggs. This fact suggests that for *Salmonella* egg analysis, only the egg internal part should be used because the shell can determine interference in technique.

Key words: *Salmonella*, eggs, extraction, DNA, PCR.

INTRODUÇÃO

A busca da metodologia ideal para o diagnóstico das salmoneloses nos animais, nos alimentos e no homem começou no momento da sua descrição como agente patogênico e permanece até hoje. Várias alternativas têm sido pesquisadas como imunoensaios, imunodifusão, aglutinação em látex, e hibridização do DNA (BLACKBURN, 1993).

¹Parte da Tese de Doutorado do primeiro autor, no Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Apoio financeiro: FAPERGS, FINEP, FFFCMPA, Cenbiot^{Enzimas}, UFRGS, CDPA-UFRGS, FIPE-UFSM.

²Médico Veterinário, Professor Adjunto, MSc., Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, UFSM, Santa Maria - RS, 97105-900. E-mail: patoaves@ccr.ufsm.br. Autor para correspondência.

³Médico Veterinário, Professor Adjunto, PhD., UFRGS.

⁴Farmacêutico, Professor Titular, Doutor. Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre.

⁵Médico Veterinário, Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, UFRGS.

A ocorrência de surtos de intoxicação alimentar por salmonelas em diversos países chamou a atenção para fontes comuns de infecção. As investigações epidemiológicas identificaram o consumo de ovos ou alimentos contendo ovos como responsáveis pela maioria dos surtos. PINTO (1999), ao examinar os dados coletados no Rio Grande do Sul, das enfermidades transmitidas por alimentos, pela Secretaria da Saúde e do Meio Ambiente, relata semelhança com as informações de outros lugares do mundo, como os alimentos mais freqüentemente envolvidos e os agentes causais.

Os métodos analíticos para pesquisa de *Salmonella* em ovos e outros produtos, definem como sendo o diagnóstico bacteriológico com isolamento e identificação do agente a técnica oficial recomendada (BRASIL, 1995), porém muitas pesquisas têm sido realizadas visando a introduzir metodologias rápidas e sensíveis para enfrentarem a agilidade que o mercado atual exige.

O desenvolvimento de testes de imunocaptura (IMS) e amplificação do DNA pela Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) ou biosensores trouxe mais rapidez e precisão, com resultados sendo obtidos em torno de 24 horas (BAILEY & COX, 1996). Além disso, OYARZÁBAL (1996) observou que a PCR foi a técnica de maior aceitação entre as demais técnicas moleculares desenvolvidas recentemente, podendo ser empregada como ferramenta de diagnóstico em laboratórios clínicos.

KONGMUANG *et al.* (1994) citam que o custo de cada método 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, bem como a permanência de substâncias que podem interferir na PCR, levando à diminuição da sensibilidade da técnica.

RAHN *et al.* (1992), usando um par de oligonucleotídeos do gene *InvA*, detectaram com sucesso 626 cepas de *Salmonella* em 630 testadas, a partir de uma colônia isolada e incorporada direto na PCR, obtendo uma sensibilidade de 99,4% e especificidade de 100%, pois não observou reação positiva em nenhum controle negativo pertencentes a outras 33 enterobactérias testadas.

Neste trabalho, testaram-se duas metodologias de extração de DNA bacteriano, a partir de ovos de galinhas domésticas com casca e sem casca, contaminados artificialmente com *Salmonella typhimurium* e analisados por PCR.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram contaminados 100 ovos SPF (specific pathogen free) com 1mL de um cultivo de *Salmonella typhimurium*, resistente ao ácido

nalidíxico e à spectinomicina, em fase estacionária com cerca de $3,0 \times 10^8$ células. Após a desinfecção dos ovos com álcool iodado, eles foram abertos com assepsia e, em seu conteúdo interno, foi adicionado o inóculo, seguiu-se a homogeneização. Dessa mistura, foi pesada 25g e adicionada em 225mL de água peptonada a 1%, homogeneizadas em *stomacher* por 30s em baixa agitação e incubados a 42°C/24 horas, quando foram colhidas amostras de 1mL para os procedimentos de extração e posterior PCR.

As amostras de ovo total, com casca, foram obtidas pela trituração do ovo em saco plástico esterilizado e seguiu-se o mesmo procedimento já descrito para a parte interna dos ovos.

As metodologias de extração do DNA utilizadas foram as seguintes: tratamento térmico, constando de centrifugação inicial a 2.040g/4min, descarte do sobrenadante e acréscimo de 1,0mL de tampão TE (Tris+EDTA). Seguindo-se de agitação em vortex, centrifugação a 2.040g/5min, descarte do sobrenadante e acréscimo de 350µL de TE, novo vortex. O aquecimento ocorreu em bloco térmico (Baxter Scientific Products), a 95°C/5min, seguido de centrifugação rápida em microcentrífuga; logo após, coletou-se o sobrenadante para a PCR. A extração pelo fenol-clorofórmio seguiu protocolo descrito por SAMBROOK *et al.* (1989).

O par de iniciadores (GibcoBRL) consistiu de uma seqüência do gene *Inv A*, citada por RANH *et al.* (1992), com uma amplificação esperada de 284pb, utilizado neste experimento com uma concentração de 5,0nmol/mL.

A PCR foi realizada em aparelho termociclador (Perkim Elmer gene Amp PCR system 2400, New Jersey, USA) com um volume final de 25 µL, constando de 16,3µL de água miliQ, 0,5µL da enzima *Taq DNA* polimerase (Cenbiot^{Enzimas}/UFRGS), 2,5µL de tampão 10x da PCR (Cenbiot^{Enzimas}/UFRGS), 1,2µL de soro albumina bovina (Sigma), 2,0µL da mistura de dNTPs (5mM, GibcoBRL), 0,5µL de cada par de iniciadores e 1,0µL da amostra. Em todas reações, foram adicionados controles negativos, sem DNA, no lugar da amostra. Os controles positivos foram amostras de DNA de *Salmonella typhimurium* com 63ng/µL.

A PCR obedeceu aos seguintes ciclos: 95°C/1 minuto para desnaturação inicial; 94°C/1 minuto, 30 ciclos; 54°C/30 segundos, 30 ciclos; 72°C/1 minuto, 30 ciclos e 72°C/7 minutos para a extensão final. Os produtos da PCR foram analisados em gel de agarose a 2%, contendo brometo de etídio 1,0µg/mL (GibcoBRL). Como marcador de peso molecular utilizou-se DNA ladder 100pb (GibcoBRL), a visualização foi realizada em apare-

lho transiluminador (Pharmacia LKB, Macrouve) e fotografados com câmara polaróide.

A análise estatística efetuada pelo teste do Qui-quadrado em que foram comparados os resultados positivos e negativos em ambos os métodos de extração e entre as amostras procedentes de ovos sem ou com casca, independentemente do método de extração.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A comparação entre os dois métodos de extração do DNA utilizados no experimento pode ser observada na tabela 1, em amostras de ovos com casca, não sendo possível detectar diferença estatística significativa, mesmo em simulação estatística com número maior de amostras.

Os 12% de diferença entre amostras positivas na extração pelo método do fenol 36/50, contra 30/50 no tratamento térmico, demonstram que a metodologia do fenol determinou detecção de salmonelas em maior número de amostras, sugerindo que a perda de identificação destes seis ovos na metodologia pelo tratamento térmico poderiam determinar prejuízos importantes à saúde pública.

Na tabela 2, a avaliação foi realizada apenas com uma mistura da parte interna dos ovos, comparando os dois métodos de extração da mesma forma que com o ovo total. A diferença a favor da metodologia do fenol subiu para 26%, sendo estatisticamente significativa ($P < 0,003$). A recuperação de ovos contaminados melhorou bastante mas não suficiente. Vários fatores podem ter favorecido a ocorrência destes resultados nos quais a coagulação das proteínas dos ovos, ao serem submetidos ao aquecimento, pode ter influenciado na retenção do DNA bacteriano. Outro aspecto é a purificação da amostra que é efetuada na extração pelo fenol em que resíduos provenientes dos ovos, interferentes à PCR, tenham sido eliminados.

No diagnóstico clínico, no entanto, os números das tabelas 1, 2 e 3 são o bastante para concluir-se que é necessário estudos com outros métodos de extração e purificação de DNA para melhorar a recuperação das salmonelas presentes em ovos, uma vez que a sensibilidade máxima obtida foi

Tabela 1 - Comparação entre os métodos de extração de DNA na detecção de *Salmonella typhimurium* em ovos com casca pela PCR.

Resultado	Tratamento Térmico		Fenol		Total	
	N	%	N	%	N	%
Positivo	30	60,00	36	72,00	66	66,00
Negativo	20	40,00	14	28,00	34	34,00
Total	50	100,00	50	100,00	100	100,00

$X^2 = 1,60 (P > 0,05)$.

Tabela 2 - Comparação entre os dois métodos de extração de DNA, realizados da parte interna dos ovos, na detecção de *Salmonella typhimurium* pela PCR.

Resultado	Térmico		Fenol		Total	
	N	%	N	%	N	%
Positivo	30	60,00 ^b	43	86,00 ^a	73	73,00
Negativo	20	40,00 ^a	07	14,00 ^b	27	27,00
Total	50	100,00	50	100,00	100	100,00

$X^2 = 8,57 (P < 0,003)$.

a,b= letras diferentes indicam percentuais estatisticamente diferentes pelo teste do X^2 .

de 86% na metodologia de extração pelo fenol-clorofórmio, em amostras contendo apenas a parte interna dos ovos.

Dois métodos de extração de DNA bacteriano presente em alimentos foram testados por DICKINSON *et al.* (1995). O primeiro, com lise rápida, usando um tampão com proteinase K, para lisar as células e solubilizar as amostras. O segundo, com tolueno e mutanolisina para lise celular e solubilização com tiocinato de guanidina. Em ambas extrações, o DNA foi precipitado com isopropanol, obtendo resultados semelhantes ao comparar os dois métodos de extração.

LAGATOLLA *et al.* (1996), ao realizar PCR para detectar salmonelas provenientes de diferentes materiais clínicos e conservadas no meio de Luria-Bertani, compararam dois métodos de extração de DNA, o primeiro com fenol-clorofórmio e o segundo com tratamento pelo calor a 95°C/10 minutos. Após uma primeira etapa idêntica com a utilização de lisozima, duodecil sulfato e proteinase K, da mesma forma não observaram diferença significativa entre as metodologias testadas.

Ao fazer-se a comparação entre os totais de positivos nas tabelas 1 e 2, obteve-se a tabela 3, com resultados que mostram ser a parte interna dos ovos, a porção mais indicada para diagnóstico de salmonelas por PCR, independente da metodologia de extração utilizada.

A realização da PCR direto de material clínico, alimentos ou cultivos têm sido possível, mas determinados procedimentos de extração incrementam sua performance, uma vez que diferentes substâncias presentes nas amostras clínicas como, concentrações elevadas de proteínas, de íons cálcio, sais biliares ou componentes de meios de cultivo podem inibir a técnica (ROSSEN *et al.*, 1992).

A composição química do ovo total da galinha sem casca é de 74% de água, 13% de proteína, 11% de gordura, 0,7% de hidratos de carbono, com concentrações elevadas de cálcio, fósforo, sódio, potássio, cloro e magnésio. A casca possui 98% de substâncias inorgânicas, dos quais 95% são car

Tabela 3 - Comparação entre os totais de amostras positivas para *Salmonella* colhidas de ovos com casca e sem casca e submetidas à PCR.

Resultado	Ovos com casca		Ovos sem casca	
	N	%	N	%
Positivo	66	66,00 ^b	73	73,00 ^a
Negativo	34	34,00 ^b	27	27,00 ^a
Total	100	100,00	10	100,00

$\chi^2 = 3,956$ ($P < 0,047$).

a, b- letras diferentes indicam percentuais estatisticamente diferentes pelo teste χ^2 .

Bonato de cálcio e o restante composto de carbonato de magnésio e fosfato tricálcio (FEHLHABER & JANETSCHKE, 1995), constituintes que poderiam causar interferências semelhantes às citadas por ROSSEN *et al.* (1992).

Ao compararem-se os custos das metodologias empregadas, a extração térmica é duas vezes mais barata que a pelo fenol-clorofórmio, pois nas condições em que se realizou o experimento, os procedimentos de extração custaram, por amostra, R\$ 1,80 pelo tratamento térmico e R\$ 4,24 pelo fenol-clorofórmio. Ainda, teve-se o envolvimento de um tempo de cerca de seis horas a mais para completar-se a metodologia do fenol-clorofórmio com muita manipulação das amostras, podendo favorecer contaminações cruzadas ou perda do DNA alvo.

A tecnologia da PCR, incluindo os equipamentos necessários, não é inacessível, comparada com equipamentos e materiais utilizados para um teste de ELISA; em algumas situações, o teste de ELISA é mais caro. A formação de pessoal habilitado é outro fator a ser discutido, porém muito difícil de avaliar-se, pois nota-se que a metodologia da PCR depois de padronizada é de fácil execução.

CONCLUSÕES

Com esses resultados, pode-se concluir que a metodologia de extração de DNA pelo fenol-clorofórmio, da forma aqui empregada foi mais efetiva na recuperação de salmonelas em ovos, tanto com casca (72%), como sem casca (86%). A favor da metodologia térmica, tem-se o tempo de diagnóstico, reduzido em seis horas, pouca manipulação das amostras e custo menor.

A pesquisa de outras metodologias de extração poderão determinar melhor sensibilidade da técnica para detecção de salmonelas em ovos e definir se a presença da casca inibiu a técnica, sugerindo testes com diferentes quantidades de casca.

Essa influência da casca na PCR, ou na quantidade de DNA recuperado no processo de extração, permite concluir que a análise de ovos por PCR deve ser realizada a partir apenas do seu conteúdo interno.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAILEY, J.S., COX, N.A. Detecting specific *Salmonella* strains. **World Poultry, Special for Salmonella**, Netherlands, May, p.18-19, 1996.
- BRASIL, Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária, Secretaria da Defesa Agropecuária. Método Analítico de Carcaças de Aves e Pesquisa de *Salmonella*. **Diário Oficial da União**, Brasília, Portaria nº.08 de 23/01/1995, p.1182-1184, em 27/01/95.
- BLACKBURN, C.W. A review, rapid and alternative methods for the detection of *Salmonellas* in foods. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.3, n.75, p.199-214, 1993.
- 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.
- FEHLHABER, K. & JANETSCHKE, H. **Higiene veterinária de los alimentos**. Acribia : Zaragoza, 1995. 660p.
- 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**, Washington, v.32, n.12 p.3072-3074, 1994.
- LAGATOLLA, C., DOLZANI, L., TONIN, E. *et al.* PCR ribotyping for characterizing *Salmonella* isolates of different serotypes. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.34, n.10, p.2440-2443, 1996.
- PINTO, A.T. **Ocorrência de enfermidades bacterianas transmitidas por alimentos no estado do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre, RS, 1999. 124p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1999.
- OYARZÁBAL, O.A. Técnicas moleculares para o diagnóstico de patógenos aviários. **Avicultura Profissional**, v.14, n.16, p.19-21, 1996.
- RAHN, K., De GRANDIS, S.A., CLARKE, R.C. *et al.* Amplification of *InvA* gene sequence of *Salmonella typhimurium* by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*. **Molecular and Cellular Probes**. London, v.6, p.271-279, 1992.
- ROSSEN, L., NORSEKOV, P., HOLMSTROM, K. *et al.* Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA extraction solutions. **International Journal of Food Microbiology**, v.17, p.37-45, 1992.
- SAMBROOK, J., FRITCSH, E.F., MANIATIS, T. **Molecular cloning: A laboratory manual**. 2. ed. New York : Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. 3v. 3104p.