

IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE *Salmonella* spp. EM CONTEÚDO INTERNO DE MOSCAS (DÍPTERA) PRESENTES EM GRANJA AVÍCOLA

Germana Vizzotto Osowski¹, Elton Orlandin² e Sabrina Castilho Duarte³

¹Graduanda em Ciências Biológicas pela Universidade do Oeste de Santa Catarina, Campus Joaçaba, Estagiária da Embrapa Suínos e Aves, Bolsista CNPQ/PIBIC, germanavizzottoosowski@hotmail.com.

²Graduando em Ciências Biológicas pela Universidade do Oeste de Santa Catarina, Campus Joaçaba.

³Pesquisadora da Embrapa Suínos e Aves.

Palavras-chave: dípteros, vetor biológico, PCR.

INTRODUÇÃO

Doenças transmitidas por alimentos são um sério problema de saúde pública. A Organização mundial da Saúde estima que a ingestão de alimentos deteriorados é a causa da morte de dois milhões de pessoas por ano. Os dados mostram que uma das principais causas é a *Salmonella* spp., (1), bactéria da família *Enterobacteriaceae* associada a gastroenterites humanas (2), sendo responsável por cerca de 52 mil mortes. A maioria das doenças que acometem o homem são causadas por micro-organismos veiculados por insetos (3) dentre estes, as moscas (Diptera), desempenham um papel importante na transmissão de doenças, pois possuem uma série de hábitos que incluem associação com matéria em decomposição, lixo, fezes e outras fontes semelhantes, o que favorece a propagação de agentes patogênicos, principalmente pelo fato de serem insetos sinantrópicos. Essas moscas podem atuar como vetor biológico, mecanismo no qual os micro-organismos infectantes se multiplicam e desenvolvem antes de serem transmitidos para o hospedeiro. Em alguns casos, são capazes de se multiplicar, colonizando o trato digestivo da mosca, aumentando o potencial vetorial, uma vez que esta continua a disseminar o agente etiológico por meio da defecação e regurgitação. Estudos mostram o número de micro-organismos patogênicos no canal alimentar das moscas pode ser três vezes maior do que em sua superfície externa (4). Por outro lado, as moscas podem atuar como vetores mecânicos, transmitindo diretamente um micro-organismo infectante, sem que este passe por desenvolvimento ou multiplicação, sendo transportados de sujidades para o alimento, por meio dos orifícios, patas e pelos das moscas (5).

Apesar da grande quantidade de material disponível sobre insetos como vetores biológicos, ainda é um desafio estabelecer um protocolo que favoreça um diagnóstico rápido, sensível e confiável capaz de diferenciar contaminações externas e micro-organismos presentes no conteúdo interno das moscas. As moscas permanecem no alimento por um curto período de tempo, e provavelmente transferem bactérias presentes na sua superfície corporal, entretanto quando se alimentam, pelo hábito de regurgitar e defecar no alimento enquanto o consomem, aumentam a probabilidade de transferência de patógenos (6). O objetivo do presente trabalho foi estabelecer um protocolo para detecção do DNA de *Salmonella* spp. em moscas, diferenciando contaminação interna e externa pela PCR em paralelo a análises utilizando bacteriologia convencional.

MATERIAL E MÉTODOS

As coletas foram feitas no estado do Espírito Santo, município de Santa Maria do Jetibá, em uma granja com condições de higiene precária. Foram incluídas no estudo 15 moscas, capturadas segundo protocolo adaptado de Pava-Ripol et al., 2015 (7). As moscas foram acondicionadas em álcool 70% imediatamente após a coleta e posteriormente em tubos de ensaio contendo 4 mL de Caldo Peptonado Tamponado (CPT) a 37°C. O tubo foi invertido durante 2 minutos para garantir a imersão dos micro-organismos no caldo, após a retirada das moscas este tubo foi incubado a 37°C por 24 horas (pré-lavagem). Em seguida foram transferidas para tubos limpos previamente identificados para sucessivas lavagens, estabelecendo-se lavagem em 1 mL de etanol a 70% durante 1 minuto, seguida de 3 lavagens com água destilada. Para avaliar a eficácia do processo de desinfecção, foi transferido 100 µL de água a partir do último enxague para um tubo contendo CPT, e em seguida este tubo também foi incubado em estufa a 37°C por 24 horas (pós lavagens). Com auxílio de pinças esterilizadas, o canal alimentar das moscas foi retirado e transferido para um tubo contendo CPT, com as mesmas condições de incubação descritas acima (conteúdo interno). As moscas foram identificadas com auxílio de lupa segundo chave elaborada por Carvalho e Mello-Patiu (2008) (7). Os tubos oriundos da incubação, obtidos na pré-lavagem, pós-lavagem e conteúdo interno foram transferidos para meio Rappaport e Tetrationsato, incubados por 42°C, seguido de cultivo em Hektoen e XLT4, posteriormente foram submetidos a extração com o kit de extração Cador patogen da Qiagen® de acordo com as instruções do fabricante.

Para a preparação do *mix* da PCR foi estabelecido o volume de 50 µL, composto por 35,75 µL de água ultra pura, 5 µL de Tampão para PCR 10X, 2,0 µL de Cloreto de Magnésio (MgCl₂) 50 mM, 1 µL de dNTP 10 mM, 0,5 µL (10 mM) do iniciador *forward*, 0,5 µL (10 mM) do iniciador *reverse*, 0,25 µL de Taq 5 U/µL (Invitrogen ® e 5 µL do DNA genômico da amostra. Foram utilizados os pares de iniciadores *primer* F (5' GTG AAA TTA TCG CCA CGT TCG GGC AA 3') e *primer* R (5' TCA TCG CAC CGT CAA AGG AAC C 3') (5) para detecção do gene *inv* para *Salmonella* spp. O processo de amplificação foi realizado em termociclador programado para um ciclo inicial de 95 °C por 3 minutos (desnaturação inicial), seguido de

40 ciclos repetidos de 94 °C por 30 segundos (desnaturação), 61° C por 30 segundos (anelamento) e 72°C por 30 segundos (extensão). A programação era finalizada com 10 minutos a 72°C (extensão final). Como controle positivo foi utilizada *Salmonella* (ATCC 19361) e o controle negativo foi 1 µL de água ultra pura em substituição ao DNA da amostra. Os produtos de DNA amplificados foram aplicados em gel de agarose 1,2%. Após a eletroforese os géis foram corados por imersão em solução de brometo de etídio e os produtos visualizados em transiluminador de UV.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 15 moscas coletadas, 10 pertenciam ao gênero *Chrysomya* sp. Robineau-Desvoidy (Calliphoridae); quatro foram identificadas como *Musca domestica* (Linnaeus, 1758) (Muscidae), e uma não foi possível identificar. Não houve isolamento de *Salmonella* spp. nas amostras submetidas ao teste bacteriológico, provavelmente por estas terem sido transportadas do local de coleta ao laboratório imersas em álcool 70% o que deve ter eliminado contaminações externas.

Nas análises moleculares, oito moscas foram positivas na PCR. A etapa de pré-lavagem resultou positiva para *Salmonella* spp. em duas amostras. Ou seja, a técnica possibilitou detectar DNA nestas moscas ainda que a bacteriologia convencional não tenha permitido isolamento da bactéria. A análise de pós-lavagem apresentou resultado negativo para todas as moscas, demonstrando que o protocolo de limpeza adotado na metodologia foi eficiente, descartando a possibilidade de contaminação cruzada na hora da coleta do trato alimentar. O conteúdo interno apresentou positividade em seis moscas, o que indica a presença de *Salmonella* spp. colonizando o conteúdo interno de moscas presentes em granjas avícolas.

CONCLUSÕES

Pela utilização da PCR foi possível identificar moscas portadoras de *Salmonella* spp. coletadas em granja avícola. A técnica é útil para identificação desta bactéria nestes insetos. Pelo protocolo que foi padronizado foi possível diferenciar contaminações externa e interna de moscas infectadas pela bactéria.

Apoio Financeiro: CNPq bolsa PIBIC e projeto SEG/Embrapa (03.13.10.005).

REFERÊNCIAS

1. Segurança alimentar. **Organização Mundial de Saúde**, 07 abr 2015. Disponível em: <http://www.paho.org/bireme/index.php?id=281%3Aseguranca-alimentar-e-tema-do-dia-mundial-da-saude-2015&option=com_content>. Acesso em: 09 ago. 2007.
2. SHAH DH, CASAVANT C, HAWLEY Q, ADDWEBI T, CALL DR, GUARD J. *Salmonella* Enteritidis strains from poultry exhibit differential responses to acid stress, oxidative stress and survival in the egg albumen. **Foodborne Pathog Dis.** 2012;9(3):258-64.
3. ENCICLOPÉDIA Mirador Internacional. São Paulo: **Encyclopaedia Britannica do Brasil**, 1995. 20 v.
4. PAVA-RIPOLL, M., PEARSON, R. E. G., MILLER, A. K., ZIOBRO, G. C. Prevalence and relative risk of Cronobacter spp., Salmonella spp., and Listeria monocytogenes associated with the body surfaces and guts of individual filth flies. **Applied and Environmental Microbiology.** 78, (22), 7891-7902 (2012).
5. BOWMAN, D.D., **Parasitologia Veterinária de Georgis**, 8ª Ed. p. 03-19, Manole, 2006.
6. PAVA-RIPOLL, M., PEARSON, R.E., MILLER, A.K., ZIOBRO, G.C. Detection of Foodborne Bacterial Pathogens from Individual Filth Flies. **J. Vis. Exp.** (96), e52372, doi:10.3791/52372 (2015).
7. CARVALHO, Claudio José Barros de; MELLO-PATIU, Cátia Antunes de. Key to the adults of the most common forensic species of Diptera in South America. **Revista Brasileira de Entomologia**, São Paulo , v. 52, n. 3, p. 390-406, Sept. 2008 . <http://dx.doi.org/10.1590/S0085-56262008000300012>