



## DETECÇÃO DOS SOROTIPOS ENTERITIDIS E HEIDELBERG DE SALMONELLA POR MÉTODO DE AMPLIFICAÇÃO ISOTÉRMICA DE DNA

Lucas Michel Wolf<sup>1,2</sup>  
Jéssica Waldman<sup>2</sup>  
Margarida Neves Souza<sup>2</sup>  
Jonas Michel Wolf<sup>2</sup>  
Nilo Ikuta<sup>2,3</sup>  
Vagner Ricardo Lunge<sup>3,4</sup>

### Resumo

*Salmonella* é uma bactéria causadora de doenças humanas, normalmente devido à ingestão de alimentos de origem animal. Existem mais de 2.600 sorotipos de *Salmonella*, mas alguns apresentam maior disseminação nos animais, elevada patogenicidade e, portanto, são responsáveis pela maioria dos surtos de infecção alimentar na população. Enteritidis é o sorotipo mais frequente em surtos de alimentos contaminados de origem animal na população humana, enquanto Heidelberg é o principal sorotipo encontrado nas carnes de frango. A detecção de *Salmonella*, com identificação de sorotipos, requer uma série de etapas laboratoriais de isolamento bacteriano, caracterização bioquímica e testes sorológicos. Métodos de análise de DNA são alternativas para a detecção direta de *Salmonella* e sorotipos, com destaque para a amplificação isotérmica de DNA pela técnica de LAMP (*loop mediated isothermal amplification*). Este estudo objetivou estabelecer a detecção de *Salmonella* dos sorotipos Enteritidis e Heidelberg pela técnica de LAMP. A metodologia consistiu no desenho e aquisição de *primers*, seguida da implementação dos métodos de LAMP no laboratório. Após foi realizada a análise comparativa dos métodos com testes sorológico e molecular (PCR em tempo real) na avaliação de 40 isolados de nove sorotipos importantes (sendo 14 (35%) de Enteritidis e 12 (30%) de Heidelberg) obtidos do LACEN-RS. Os resultados demonstraram que os 14 isolados de Enteritidis e os 12 de Heidelberg foram detectados somente pelos testes de PCR e LAMP específicos para cada sorotipo. A análise comparativa demonstrou total concordância entre PCR e LAMP, indicando excelente desempenho analítico dos métodos de LAMP.

Palavras chave: *Salmonella*; Enteritidis; Heidelberg; LAMP; PCR.

### INTRODUÇÃO

*Salmonella* é um dos principais agentes bacterianos com capacidade de causar doenças pelo consumo de produtos de origem animal, tais como ovos, carnes, lácteos, entre outros (Schroeder *et al.*, 2006). A doença apresenta sintomas característicos como náuseas, vômitos, diarreia intensa, febre baixa, prostração, cólicas intestinais e dores de cabeça. Geralmente, os alimentos são contaminados pela presença da bactéria no ambiente de criação dos animais e durante o procedimento de abate, caso não sejam tomados cuidados higiênico-sanitários (MAJOWICZ *et al.*, 2010).

<sup>1</sup> Aluno do curso de Medicina Veterinária - Bolsista PROBITI – FAPERGS – lucaswolf503@gmail.com

<sup>2</sup> Laboratório de Diagnóstico Molecular – ULBRA –

<sup>3</sup> Professor do PPGBioSaúde – vagner.lunge@gmail.com

<sup>4</sup> Orientador - vagner.lunge@gmail.com

O gênero *Salmonella* é classificado em duas espécies: *S. enterica* e *S. bongori* (CDC, 2011). No entanto, a principal classificação é por sorotipos, sendo demonstrados mais de 2.600 variantes antigênicas (GRIMONT; WEILL, 2007; GUIBOURDENCHE et al., 2010). As denominações dos sorotipos e as respectivas fórmulas antigênicas estão listadas no documento *Kauffmann-White-Le Minor* (KWL) (ISSENHUTH-JEANJEAN et al., 2014).

A detecção específica de sorotipos é rotineiramente realizada por uma sucessão de procedimentos laboratoriais: isolamento bacteriano, caracterização bioquímica e sorologia. Técnicas de diagnóstico molecular de *Salmonella* têm sido desenvolvidas e são bastante utilizadas em contextos laboratoriais. Métodos baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês *polymerase chain reaction*) possibilitam tanto a detecção direta de *Salmonella* como a identificação dos respectivos sorotipos (IKUTA et al., 2009). Mais recentemente, novas técnicas moleculares foram desenvolvidas para detecção de sorotipos específicos, entre as quais a amplificação isotérmica de DNA por LAMP (do inglês, *loop mediated isothermal amplification*) (YANG et al., 2010). A técnica de LAMP envolve o uso de um conjunto de 4 a 6 *primers* e *Bst* DNA polimerase, o que possibilita a amplificação de DNA de maneira altamente específica sob condições isotérmicas em menos de uma hora (YANG et al., 2010). Neste aspecto, ensaios de LAMP podem ser realizados em termoblocos simples, sem necessidade de termocicladores como na PCR (YANG et al., 2010).

O presente estudo objetivou estabelecer a detecção dos sorotipos Enteritidis e Heidelberg de *Salmonella* por método de amplificação isotérmica de DNA baseado em LAMP.

## **METODOLOGIA**

### **Amostras**

Foram utilizados 40 isolados de *Salmonella* do Laboratório Central do Estado do RS (LACEN-RS), sendo 12 (30,0%) obtidos de amostras clínicas humanas, 17 (42,5%) de alimentos e 11 (27,5) de carcaças de frangos. Esses 40 isolados haviam sido previamente caracterizados e foram classificados pelos seguintes sorotipos: Enteritidis (n = 14; 35,0%), Heidelberg (n = 12; 30,0%), Typhimurium (n = 8; 20,0%), Braenderup (n = 1; 2,5%), Bredeney (n = 1; 2,5%), Infantis (n = 1; 2,5%), Newport (n = 1; 2,5%), Panama (n = 1; 2,5%) e Schwarzengrund (n = 1; 2,5%).

### **Isolamento bacteriano**

O isolamento destas bactérias foi realizado por enriquecimento em caldos, como *Brain Heart Infusion* (BHI) ou *Rapaport-Vassiliadis* (RV), seguido de plaqueamento em meios sólidos seletivos como *Salmonella-Shigella* (SS), xilose-lisina-desoxicolato (XLD) e Verde Brilhante (VB). A incubação em todos os meios de cultura foi realizada em condições de aerobiose a 37 °C por 18-24h. As colônias típicas do gênero *Salmonella* nos meios seletivos (XLD ou VB) foram selecionadas para a identificação presuntiva usando o ágar *Triple Sugar Iron* (TSI). Colônias de 1 a 2 mm de diâmetro com centro enegrecido no ágar SS, após 24 horas de incubação (sugestivas do gênero *Salmonella*) foram submetidas à caracterização bioquímica.

### **Caracterização bioquímica**

As provas bioquímicas consistiram na utilização de carboidratos (glicose, lactose, sacarose, manitol e maltose), prova de produção de indol, prova do vermelho-de-metila, prova de Voges-Proskauer, prova da utilização do citrato, prova de redução de nitratos, motilidade, prova de produção de urease, prova de produção de fenilalanina desaminase, atividade de citocromo oxidase e prova da descarboxilação dos aminoácidos (lisina, arginina e ornitina), entre outras.

### **Serotipagem**

Os sorotipos foram classificados com base no procedimento de KWL. De forma inicial, os isolados suspeitos de *Salmonella* foram analisados por aglutinação em lâmina com antissoros específicos para antígenos O, o qual é baseado na análise de lipopolissacarídeos, que são classificados nos grupos A, B, C1, C2, D e E. Os antissoros H (flagelares) e Vi são reservados para o uso em identificações específicas. Atualmente este método emprega mais de 150 antissoros O e H para a caracterização dos sorotipos de *Salmonella*. Considera-se como reação positiva quando é observada a ocorrência de aglutinação na gota que contém o soro anti-Salmonella e negativa quando não há aglutinação.

### **Extração do DNA**

O método utilizado para a realização da extração foi o de adsorção do DNA em sílica. Sendo utilizado para a realização do procedimento o kit comercial NewGene (Simbios Biotecnologia, Cachoeirinha - Brasil).

### **Detecção molecular**

Os DNAs de todos os 40 isolados foram submetidos aos ensaios de PCR em tempo real e LAMP. Primeiramente, as amostras foram submetidas aos ensaios de LAMP, para

detecção de Enteritidis (gene *safA*) e Heidelberg (gene *ACF69659*), tendo a avaliação dos resultados por análise colorimétrica. As condições utilizadas nos ensaios de LAMP foram um ciclo de 65 °C por 60 min e um ciclo de 80 C° por 5 min. Para a confirmação dos resultados foi realizada eletroforese em gel de poliacrilamida.

De forma confirmatória, foram efetuados os ensaios com a técnica de PCR em tempo real no equipamento *StepOne Plus* (*Applied Biosystems*, Carlsbad CA, EUA) de acordo com Souza *et al.* (2018). As condições de termociclagem utilizadas nos ensaios de PCR foram de um ciclo de 95 °C por 3 min, seguidos por 40 ciclos de 95 °C por 15s e 60 °C por 60s. Controles positivos e negativos foram incluídos em todos os experimentos. A análise dos resultados foi realizada diretamente no equipamento (termociclador) pela avaliação da presença de curvas de amplificação e determinação dos respectivos valores de Ct (*cycle threshold*).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos experimentos dos testes moleculares (PCR e LAMP) para detecção específica do sorotipo Enteritidis (gene *safA*), 14 amostras (35%) resultaram em positivo para Enteritidis e 26 (65%) em negativo (Tabela 1). As amostras que resultaram em negativo para Enteritidis (65%) nos ensaios moleculares foram sorotipadas para outros sorotipos (Heidelberg, Typhimurium, Braenderup, entre outros) nas análises sorológicas.

Nos ensaios que tiveram Heidelberg (*ACF69659*) como sorotipo alvo, as 12 (30%) amostras que foram sorotipadas como Heidelberg nas análises sorológicas também apresentaram resultados positivos nos ensaios de PCR e LAMP (Tabela 1).

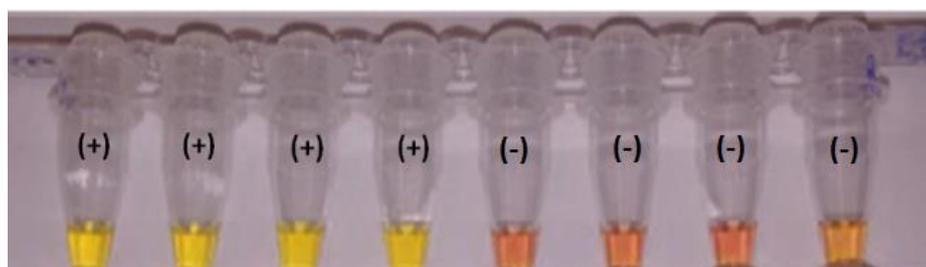
A técnica de LAMP mostrou-se bastante acessível e de rápida capacidade de análise dos resultados (por coloração, ilustrado na figura 1), além de fornecer a possibilidade de ser aplicada para a detecção rápida de diferentes agentes patogênicos de origem alimentar e outros contaminantes microbianos, fato que está de acordo com o estudo realizado por Draz e Lu (2016).

Além disso, os ensaios da técnica LAMP quando comparados com os ensaios de PCR demonstraram a mesma eficiência e grande concordância nos resultados. Além de trazer as vantagens de serem ensaios de mais rápida realização e de mesma precisão do que os ensaios de PCR (Yang *et al.*, 2013). Neste sentido, as aplicações moleculares que visam à análise de DNA possibilitam melhores desempenhos e dinamismo comparados às metodologias tradicionais de sorotipagens de salmonelas (WATTIAU *et al.*, 2011).

Tabela 1. Resultados de PCR e LAMP para a detecção dos sorotipos Enteritidis e Heidelberg

Sorotipos	n	%	Resultados moleculares			
			PCR Enteritidis	PCR Heidelberg	LAMP Enteritidis	LAMP Heidelberg
Enteritidis	14	35,0	+	-	+	-
Heidelberg	12	30,0	-	+	-	+
Typhimurium	8	20,0	-	-	-	-
Braenderup	1	2,5	-	-	-	-
Bredeney	1	2,5	-	-	-	-
Infantis	1	2,5	-	-	-	-
Newport	1	2,5	-	-	-	-
Panama	1	2,5	-	-	-	-
Schwarzengrund	1	2,5	-	-	-	-

Figura 1. Análise colorimétrica dos resultados das reações de LAMP (Os quatro primeiros tubos positivos e os quatro últimos negativos).



Em termos de otimização da técnica, as condições ótimas para as reações de LAMP foram definidas como um ciclo de 65 C° durante 40 min. Neste aspecto, estudos conduzidos por Yang *et al.*, (2010) e Ueda *et al.*, (2009) analisaram as condições ideais para a realização dos ensaios de LAMP, onde observaram o desempenho da técnica em diferentes temperaturas (60, 61, 63, e 65 C°) e em diferentes tempos de duração de ciclo (20, 30 e 40 min). Em ambos estudos, foi concluído que um ciclo de 40 min a 65C° apresenta-se como uma condição ideal para a realização dos ensaios.

A realização de análises com um maior número amostral e a elucidação da ocorrência de divergência com os resultados sorológicos são as próximas etapas do trabalho de investigação analítica do LAMP.

## CONCLUSÃO

Este estudo permitiu o entendimento desta nova técnica molecular (LAMP) a qual apresentou muitas qualidades analíticas, dentre elas estão destacadas a rápida capacidade de

análise dos resultados, através da avaliação colorimétrica, além de ser uma técnica mais acessível quando comparada a PCR, a qual necessita de equipamentos mais sofisticados para a sua performance. Além disso, todas as amostras que foram sorotipadas como Enteritidis e Heidelberg nos ensaios sorológicos e nos ensaios de PCR, também resultaram em positivo nos experimentos de LAMP, o que demonstra que esta nova técnica pode ser utilizada para detecção de alvos específicos e, através de seu bom desempenho, coloca-se como uma ótima alternativa para testes de detecção molecular.

## REFERÊNCIAS

CDC. National Salmonella Surveillance Overview. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services, CDC, 2011. Disponível em: [http://www.cdc.gov/national-surveillance/PDFs/NationalSalmSurveilOverview\\_508.pdf](http://www.cdc.gov/national-surveillance/PDFs/NationalSalmSurveilOverview_508.pdf). Acesso em: maio de 2017.

DRAZ, M.S, LU, X. Development of a Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP)-Surface Enhanced Raman spectroscopy (SERS) Assay for the Detection of Salmonella Enterica Serotype Enteritidis. **Theranostics**. v. 6, n. 4, p. 522-532, 2016.

GRIMONT, P.A.D, WEILL, F. **Antigenic Formulae of the Salmonella Serovars**. 9a ed. Paris: WHO Collaborating Center for Reference and Research on Salmonella. Paris: Institut Pasteur, 2007.

GUIBOURDENCHE, M; ROGGENTIN, P, MIKOLEIT, M, et al. Supplement 2003-2007 (No. 47) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. **Res Microbiol**. v.1, n.161, p. 26–29, 2010.

IKUTA, N; FONSECA, A; LUNGE, V. **Diagnóstico molecular**. In: Berchieri A, Silva EM, di Fábio J, et al (ed). Doenças das aves. 2ª ed. Campinas: Facta, p. 105-119, 2009

ISSENHUTH-JEANJEAN, S; ROGGENTIN, P; MIKOLEIT, M, et al. Supplement 2008-2010 (no. 48) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. **Res Microbiol**. v. 165, n. 7, p. 526–530, 2014.

MAHITTIKORN, Aongart et al. Development of a loop-mediated isothermal amplification technique and comparison with quantitative real-time PCR for the rapid visual detection of canine neosporosis. **Parasites & vectors**, v. 10, n. 1, p. 394, 2017.

MAJOWICZ, S.E; MUSTO, J; SCALLAN, E et al. The global burden of nontyphoidal Salmonella gastroenteritis. **Clin. Infect. Dis**. v. 50, p. 882–889, 2010.

SCHROEDER, C.M; LATIMER; H.K, SCHLOSSER, W.D, et al. Overview and summary of the Food Safety and Inspection Service risk assessment for Salmonella enteritidis in shell eggs, October 2005. **Foodborne Pathog Dis.**, v. 3, n. 4, p. 403–412, 2006.

SOUZA, M.N; LEHMANN, F.K.M; DE CARLI, S et al. Rapid Detection of *Salmonella* Serotypes Enteritidis, Heidelberg and Typhimurium in poultry samples by real-time PCR. **Poult Sci**. In Press.

UEDA, S; YOSHIHIRO, K. The rapid detection of Salmonella from food samples by loop-mediated isothermal amplification (LAMP). **Biocontrol science**. v. 14, n. 2, p. 73-76, 2009.

WATTIAU, P.; BOLAND, C; BERTRAND, S. Methodologies for Salmonella enterica subsp. Enterica suotyping: gold standards and alternatives. **Appl Environ Microbiol.**, v. 77, n. 22, p. 7877-7885, 2011.

YANG, J.L; MA, G.P; YANG, R, et al. Simple and rapid detection of Salmonella serovar Enteritidis under field conditions by loop-mediated isothermal amplification. **J Appl Microbiol.** v. 109, n. 5, p. 1715-1723, 2010.

YANG, Q; CHEN, S; GE, B. Detecting Salmonella serovars in shell eggs by loop-mediated isothermal amplification. **J Food Prot.**, v. 76, n. 10, p. 1790-1796, 2013.