



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

Lucas Michel Wolf^{1,2}, Jéssica Waldman², Margarida Neves², Jonas Michel Wolf², Nilo Ikuta^{2,3}, Vagner Ricardo Lunge^{2,3,4}

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

² Laboratório de Diagnóstico Molecular – ULBRA –

³ Professor do PPGBioSaúde – vagner.lunge@gmail.com

⁴ Orientador

INTRODUÇÃO

Salmonella é um dos principais agentes bacterianos e causa doenças pela ingestão de produtos de origem animal. Os isolados de *Salmonella* nestes alimentos podem ser de diferentes sorotipos, pois existem mais de 2.600 em todo mundo. O sorotipo Enteritidis tem sido frequentemente isolado de infecções entéricas em alimentos de origem avícola. Recentemente, o sorotipo Heidelberg também tem sido encontrado com frequência em produtos desta mesma origem devido à ampla disseminação em granjas de produção de aves.

A caracterização sorológica de *Salmonella* é necessária e requer o uso de centenas de antissoros que possibilitam a determinação da fórmula antigênica de cada isolado pelo esquema KWL (de Kauffmann-White-Le Minor). Métodos de diagnóstico molecular para detecção específica de sorotipos objetivam simplificar este processo, sendo utilizadas variações da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR, *Polymerase Chain Reaction*). Atualmente, novas técnicas foram desenvolvidas para detecção de sorotipos específicos, entre as quais LAMP (*Loop Mediated Isothermal Amplification*), que possui a grande vantagem de ser isotérmica, ou seja, não necessita de equipamentos de amplificação como os termocicladores.

OBJETIVO

Estabelecer a detecção dos sorotipos Enteritidis e Heidelberg pela técnica de LAMP.

MATERIAIS E MÉTODOS

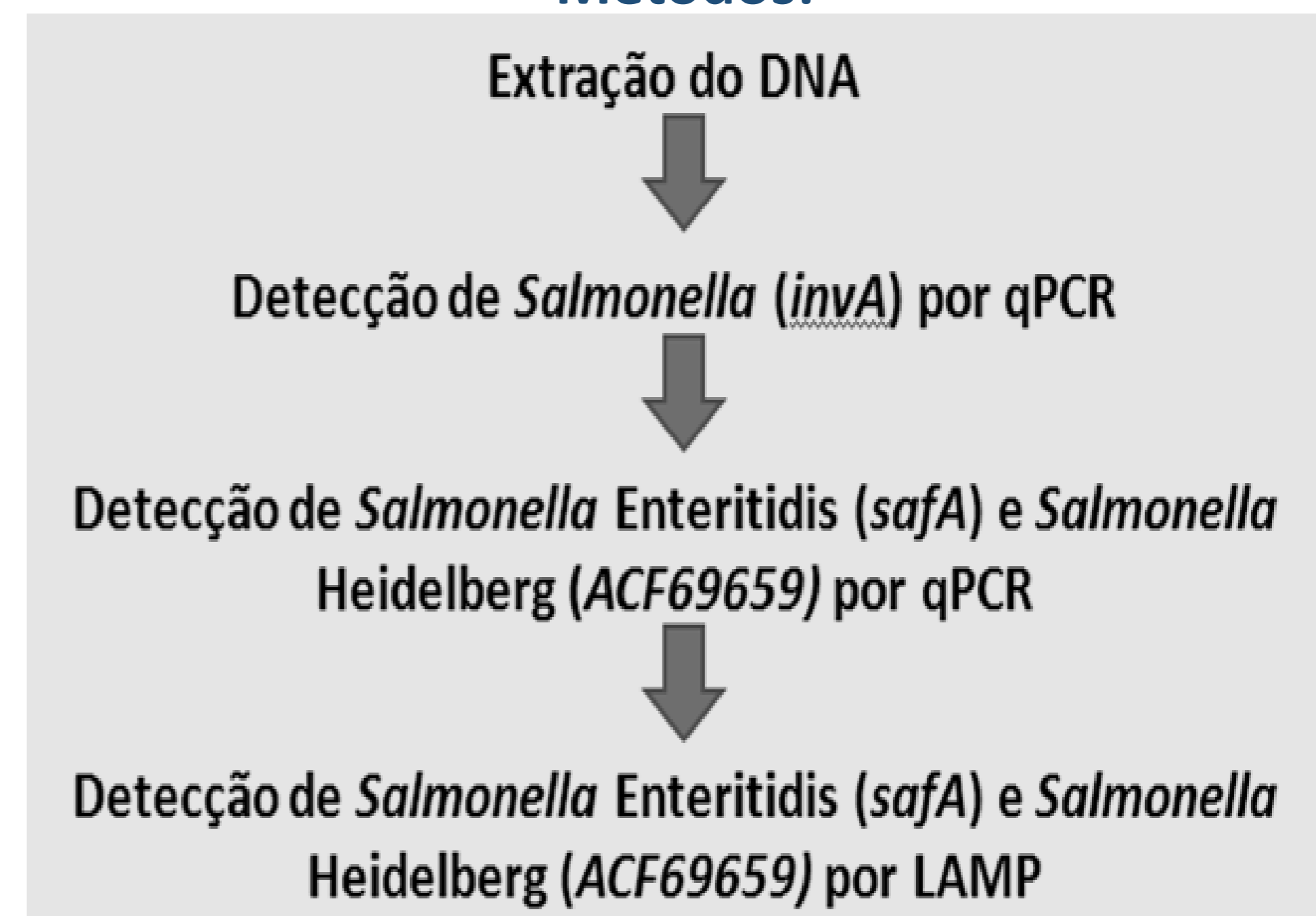
As amostras para análise foram obtidas no Laboratório Central do Estado do Rio Grande do Sul - LACEN-RS (**Tabela 1**). Os métodos consistiram em extração de DNA dos isolados e realização de testes de PCR e LAMP para detecção específica dos sorotipos Enteritidis e Heidelberg.

Amostras

Tabela 1. Sorotipos encontrados nas análises sorológicas

Sorotipos	N	%
Enteritidis	14	35
Heidelberg	12	30
Typhimurium	8	20
Braenderup	1	2,5
Bredeney	1	2,5
Infantis	1	2,5
Newport	1	2,5
Panama	1	2,5
Schwarzengrund	1	2,5
Total	40	100

Métodos:



RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos ensaios de PCR e LAMP, tendo como alvo específico Enteritidis (*safA*), 14 amostras (35%) resultaram em positivo para Enteritidis e 26 amostras (65%) em negativo. (**Tabela 2**).

Nos experimentos que tiveram Heidelberg (*ACF69659*) como sorotipo alvo, todas as amostras (30%) que foram sorotipadas como Heidelberg nas análises sorológicas também apresentaram resultados positivos nos ensaios de LAMP (**Tabela 2**).

Em resumo, a forma de análise dos resultados por padrões colorimétricos e de eletroforese estão apresentados na **figura 1**.

Tabela 2. 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	-	-	-	-

A técnica de LAMP mostrou-se bastante acessível e de rápida análise dos resultados (por coloração), de acordo com estudos anteriores (Draz & Lu, 2016).

Além disso, os ensaios da técnica LAMP quando comparados com os de PCR demonstraram a mesma eficiência e resultados concordantes (Yang et al., 2013). De acordo com estudos anteriores, os ensaios de LAMP demonstraram ser de fácil realização e podendo ser implementados para análises de amostras de campo, por serem de simples experimentação (Mahittikorn et al., 2017). As condições ótimas para as reações de LAMP foram definidas como um ciclo de 65 C° durante 40 min, condições que também foram definidas como ideais em estudos prévios, Yang et al., (2010) e Ueda et al., (2009). 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.

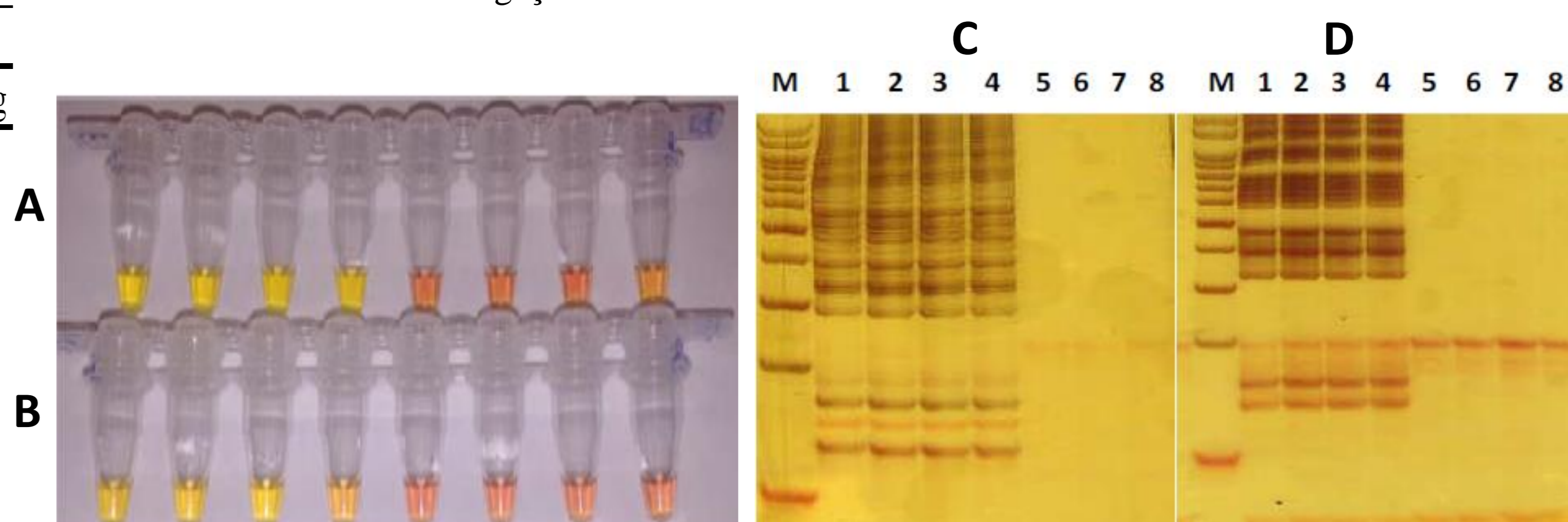


Figura 1. Fotografia dos tubos com sistema de reação depois da amplificação por LAMP de Enteritidis (A) e Heidelberg (B) e resultado da eletroforese em gel de poliacrilamida para Enteritidis (C) e para Heidelberg (D).

CONCLUSÃO

As técnicas de LAMP para a detecção dos sorotipos Enteritidis e Heidelberg apresentaram uma performance analítica muito boa. Esta técnica pode ser utilizada para detecção de alvos específicos e constitui uma ótima alternativa para testes de detecção molecular.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Draz MS, 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.
- 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.
- 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.
- 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.