



DETECÇÃO DE ISOLADOS DE *SALMONELLA* DOS SOROTIPOS ENTERITIDIS E HEIDELBERG POR TÉCNICA DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR ISOTÉRMICA

Lucas Michel Wolf^{1,2}
Iago Italo Dantas²
Rafael Reis²
Jonas Michel Wolf²
Vagner Ricardo Lunge^{3,4}
Nilo Ikuta^{3,4}

RESUMO

Salmonella é uma bactéria responsável por doenças entéricas (salmoneloses) pela ingestão de alimentos, principalmente de origem avícola. Esta bactéria é classificada em sorotipos. Entre estes, Enteritidis é tradicionalmente associado com infecções entéricas em alimentos de origem avícola. Recentemente, Heidelberg tem sido demonstrado com elevada ocorrência em produtos desta mesma origem. A detecção tradicional de sorotipos engloba etapas microbiológicas (isolamento bacteriano e caracterização bioquímica) e testes sorológicos. Técnicas de diagnóstico molecular, como a reação em cadeia da polimerase (PCR de *Polymerase Chain Reaction*), possibilitam a detecção direta de *Salmonella* e dos principais sorotipos. Recentemente, técnicas de amplificação isotérmica por LAMP (Loop Mediated Isothermal Amplification) foram desenvolvidas, apresentando a grande vantagem de não necessitarem de equipamentos sofisticados (como termocicladores). Este estudo objetivou estabelecer a detecção dos sorotipos Enteritidis e Heidelberg de *Salmonella* pela técnica de LAMP. Foram obtidos 29 isolados de *Salmonella* de amostras humanas (n=10) e de alimentos (n=17), previamente sorotipados, no Laboratório Central do Estado do RS (LACEN-RS) e pertencentes aos seguintes sorotipos: Enteritidis (n=10), Typhimurium (n=8), Heidelberg (n=2), Braenderup (n=1), Bredeney (n=1), Infantis (n=1), Newport (n=1), Panama (n=1), Schwarzengrund (n=1), Indeterminado (n=3). Primeiramente, foram realizados ensaios de PCR em tempo real para detecção específica de Enteritidis (*safA*) e Heidelberg (*ACF69659*). Após foram realizados os ensaios de amplificação isotérmica pela técnica de LAMP utilizando os mesmos genes alvo. A análise comparativa demonstrou total concordância entre os métodos de PCR e LAMP. Os dados preliminares do presente trabalho indicam um excelente desempenho analítico da técnica LAMP.

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

INTRODUÇÃO

Salmonella é um dos principais agentes bacterianos com capacidade de ocasionar doenças a partir da ingestão de produtos de origem animal, como por exemplo, ovos, carnes, produtos processados, entre outros (SCHROEDER et al., 2006). Os sintomas característicos da doença são náuseas, vômitos, diarreia intensa, febre baixa, prostração, melenas, cólicas

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

² Laboratório de Diagnóstico Molecular – ULBRA –

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

⁴ Orientador - ikuta.ulbra@gmail.com

intestinais e dores de cabeça. Os alimentos são contaminados pela presença da bactéria no ambiente de criação e durante o processamento de abate, caso não sejam tomados cuidados higiênico-sanitários adequados (MAJOWICZ et al., 2010).

A classificação da doença, baseada em investigações moleculares, estratifica o gênero em duas espécies, que são representadas por *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori* (CDC, 2011). Os isolados de *Salmonella* são também classificados em sorotipos, sendo que já foram demonstrados mais de 2.500 variantes antigênicas distribuídas globalmente com a quase totalidade (99,5%) pertencente à subespécie *enterica* (GRIMONT; WEILL, 2007; GUIBOURDENCHE et al., 2010). As denominações dos sorotipos e as respectivas fórmulas antigênicas estão listadas em um documento chamado *Kauffmann-White-Le Minor* (KWL) (ISSENHUTH-JEANJEAN et al., 2014).

A detecção específica de sorotipos é realizada por uma sucessão de três técnicas microbiológicas: isolamento bacteriano, caracterização bioquímica e identificação antigênica. Métodos de diagnóstico molecular para a detecção e caracterização de *Salmonella* têm sido formulados e empregados em laboratórios, objetivando complementar a sorotipagem. Análises moleculares, como a reação em cadeia da polimerase (PCR de Polymerase Chain Reaction), possibilitam a detecção direta de sorotipos (IKUTA et al., 2009). Mais recentemente, novas técnicas foram desenvolvidas para detecção de sorotipos específicos, entre as quais a amplificação isotérmica por LAMP (Loop Mediated Isothermal Amplification) (YANG et al., 2010;).

A técnica de LAMP foi desenvolvida como um método de detecção alternativo, onde é utilizado um conjunto de 4 ou 6 primers e a DNA polimerase Bst, esta que tem como temperatura ótima de 65 C°, e que proporciona a amplificação de DNA altamente específica sob condições isotérmicas em <1 h. Em ensaios de LAMP, toda a reação, incluindo a etapa de desnaturação, ocorre em uma temperatura constante; Sendo assim, pode ser utilizado uma incubadora simples para a realização dos experimentos (YANG et al., 2010).

O presente estudo objetivou estabelecer a detecção dos sorotipos Enteritidis e Heidelberg pela técnica de LAMP a partir de isolados de *Salmonella* de amostras clínicas humanas e de alimentos.

MATERIAIS E MÉTODOS:

Amostras:

Foram obtidos 29 isolados de *Salmonella* no Laboratório Central do Estado do RS (LACEN-RS), onde 10 são provenientes de amostras clínicas humanas e 17 de alimentos. Dentre estes

29 isolados, 10 pertencem ao sorotipo Enteritidis, 8 ao Typhimurium, 2 ao Heidelberg, 1 ao Braenderup, 1 ao Bredeney, 1 ao Infantis, 1 ao Newport, 1 ao Panama, 1 ao sorotipo Schwarzengrund e 3 foram classificados como indeterminados.

Isolamento bacteriano

O isolamento de *Salmonella* foi realizado com os meios sólidos seletivos ágar *Salmonella-Shigella* (SS), ágar xilose-lisina-desoxicolato (XLD) e ágar Verde Brilhante (VB). Anteriormente as bactérias foram enriquecidas em caldos, como o *Brain Heart Infusion* (BHI) ou *Rapaport-Vassiliadis* (RV). A incubação nos 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, incluindo provas de utilização de carboidratos (glicose, lactose, sacarose, manitol e maltose), de produção de indol, de utilização do citrato, de redução de nitratos, de 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*. A reação positiva para cada antissoro era observada pela aglutinação em lâmina.

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

Primeiramente, foram realizados os ensaios com a técnica de PCR para detecção do gênero *Salmonella* (*invA*). Após isso, as amostras foram submetidas aos ensaios de LAMP, para detecção de Enteritidis (*safA*) e Heidelberg (*ACF69659*) (tendo a avaliação dos

resultados por análise colorimétrica). A confirmação dos resultados foi realizada em gel de poliacrilamida. De forma confirmatória, foram efetuados os ensaios com a técnica de PCR em tempo real (*StepOne Plus – Applied Biosystems*, Carlsbad CA, EUA). 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:

Na realização dos experimentos em que foram utilizados testes moleculares (PCR e LAMP), 10 amostras (37%) resultaram em positivo para Enteritidis e 15 amostras (55,5%) em negativo. Tendo em vista que, primeiramente, nas análises moleculares a detecção foi específica para o sorotipo Enteritidis (*safA*). Entretanto, duas amostras (7,5%) que foram sorotipadas como Typhimurium nos ensaios das análises sorológicas, resultaram em positivo para o sorotipo Enteritidis nos ensaios moleculares. Além disso, quinze amostras (55,5%) que resultaram em positivo para outros sorotipos (Braenderup, Infantis, Panama, entre outros) nas análises sorológicas, demonstraram resultados negativos nos ensaios de LAMP e PCR.

Nos ensaios que tiveram Heidelberg (*ACF69659*) como sorotipo alvo, todas as amostras (n=2) que foram sorotipadas como Heidelberg nas análises sorológicas também apresentaram resultados positivos nos ensaios de PCR e LAMP.

A técnica de LAMP mostrou-se bastante acessível e de rápida capacidade de análise dos resultados (por coloração), 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).

Ademais, 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).



Imagem 1. Análise colorimétrica da técnica de LAMP.

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), e, em ambos estudos, também concluíram que um ciclo de 40 min de 65C° são considerados as condições ideais para a realização dos testes.

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.

CONCLUSÃO:

Este estudo permitiu o entendimento desta nova técnica molecular (LAMP) a qual apresentou muitas qualidades, dentre elas destacam – se a rápida capacidade de análise dos resultados, através da análise colorimétrica, além de ser uma técnica mais acessível quando comparada a PCR, esta que necessita de equipamentos mais caros para a realização de seus ensaios. 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 BIBLIOGRÁFICAS:

CDC. National Salmonella Surveillance Overview. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services, CDC, 2011. Disponível em: <http://www.cdc.gov/nationalsurveillance/PDFs/NationalSalmSurveilOvervie_w_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. Disponível em: <<http://www.scacm.org/free/Antigenic%20Formulae%20of%20the%20Salmonella%20Serovars%202007%209th%20edition.pdf>> Acesso em: maio de 2017.

Guibourdenche, M.; Roggentin, P.; Mikoleit, M.; *et al.* Supplement 2003-2007 (No. 47) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. **Research in microbiology**. 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. **Research in microbiology**. v. 165, n. 7, p. 526 – 530, 2014.

Majowicz, S.E.; Musto, J.; Scallan, E.; *et al.* The global burden of nontyphoidal Salmonella gastroenteritis. **Clinical infectious diseases**. 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 pathogens and disease**. v. 3, n. 4, p. 403 – 12, 2006.

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 suptyping: gold standards and alternatives. **Applied and Environmental Microbiology**. 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. **Journal of applied microbiology**. v. 109, n. 5, p. 1715 - 1723, 2010.

Yang, Q.; Chen, S.; Beilei G.E. Detecting Salmonella serovars in shell eggs by loop-mediated isothermal amplification. **Journal of food protection**. v. 76, n. 10, p. 1790 - 1796, 2013.