



## AVALIAÇÃO DA TÉCNICA LAMP (LOOP-MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION OF DNA) PARA DETECÇÃO DE SALMONELLA EM ALIMENTOS

Stefany Tauany de Queiroz **Carvalho**<sup>1</sup>, Fabiana Taminato **Imazaki**<sup>2</sup>, Sílvia **Morelli**<sup>2</sup>, Margarete Midori **Okazaki**<sup>3</sup>, Beatriz Thie **Iamanaka**<sup>4</sup>

Nº 18230

**RESUMO-** A *Salmonella* spp. é um dos microrganismos mais amplamente distribuídos na natureza, e causa grande preocupação devido à sua patogenicidade podendo levar a morte. Considerando os diversos casos de intoxicação alimentar, e a necessidade de se obter um diagnóstico rápido e eficiente, novas técnicas estão sendo criadas para detectar a presença deste micro-organismo em alimentos. A técnica de LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification of DNA) é um método capaz de amplificar os ácidos nucleicos de forma altamente específica, eficiente e rápida sob condições isotérmicas e tem sido utilizado como método alternativo para detecção de patógenos em alimentos. O objetivo desse projeto foi avaliar a técnica de LAMP, comparando com a técnica de PCR e o método cultural na detecção de *Salmonella* em diferentes matrizes: molho para salada, cacau em pó, pó para preparo de bolo e queijo ralado. As amostras foram inoculadas com a cepa de *S. Typhimurium* (ATCC 14028), em níveis baixos, variando de 1-7 células em 25g de amostra.

**Palavras-chaves:** Salmonella, LAMP, PCR.

1 Autor, Bolsista CNPq (PIBIC): Graduação em Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas-SP; stefanytauany2015@gmail.com

2 Colaborador: Técnica do laboratório de Microbiologia do Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas, SP

3 Co-orientador: Pesquisadora Laboratório de Microbiologia do Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas, SP

4 Orientador: Pesquisadora Laboratório de Microbiologia do Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas, SP; beatriz@ital.sp.gov.br



**ABSTRACT** – *Salmonella* is a pathogenic enteric bacterium and is considered one of the main agents responsible for foodborne diseases. Considering the various cases of food poisoning and a requirement for a quick and efficient diagnosis, new techniques are being developed for the detection of this microorganism in food. The LAMP (Loop Mediated Isothermal Amplification) technique is capable of amplifying nucleic acids in a specific, and rapid way under isothermal conditions and has been used as an alternative method for detecting pathogens in food. The objective of this project was to evaluate the LAMP technique compared to the PCR technique and cultural method in order to detect *Salmonella* in different matrices: salad dressing, cocoa powder, cake powder and grated cheese. Samples were inoculated with *S. typhimurium* strain (ATCC14028), at low levels, ranging from 1-7 cells in 25g of sample.

**Keywords:** *Salmonella*, LAMP, PCR.

## 1. INTRODUÇÃO

Os alimentos passam por diferentes etapas e até o seu consumo e durante este processo, estes podem sofrer diversos tipos de contaminação microbiológica.

No Brasil, foram notificados 6.848 surtos por DTA no período de 2007-2016, dentre os surtos 610.465 pessoas foram expostas, com o acometimento de 121.283 pessoas, foram hospitalizadas 17.517 (14,5%), tendo um total de 111 (0,09%) óbitos registrados. Através das pesquisas realizadas, os agentes etiológicos como *Salmonella*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* foram identificados como os surtos mais comuns (Brasil, Ministério da Saúde, 2016).

A *Salmonella* é uma bactéria entérica que está associada com doenças transmitidas por alimentos, e é responsável por intoxicações alimentares graves. É um problema de saúde pública que deve ser evitado tanto nos países desenvolvidos, como nos países em desenvolvimento pelo seu difícil diagnóstico (SHINOHARA et al., 2008).

A busca do método ideal para o diagnóstico das salmoneloses nos alimentos, nos animais e no homem começou a partir do momento em que foi descrita como um agente patogênico, e permanece até os dias de hoje. Dentre as pesquisas feitas várias alternativas vêm sendo utilizadas como imunoenaios, imunodifusão, aglutinação em látex e hibridização do DNA (FLÔRES et al., 2001). Normalmente para se fazer o isolamento e caracterização de microrganismos nos laboratórios



é uma tarefa complexa e demorada. Os métodos tradicionais de identificação microbiana envolvem uma série de características fenotípicas, morfológicas e bioquímicas. Nos últimos 10 anos, através de avanços na biologia molecular estão abrindo novas áreas para identificação microbiana (SAHARAN et al., 2014).

Um novo método utilizado é a técnica de LAMP (*Loop-Mediated Isothermal Amplification of DNA*) ou Amplificação isotérmica de DNA mediada por loop, que foi desenvolvido por uma equipe da Universidade de Tóquio, no Japão e publicado no ano de 2000, com a finalidade de amplificar os ácidos nucleicos de forma altamente específica, eficiente e rápida sob condições isotérmicas. Um protocolo de laboratório para aplicação de LAMP foi examinado e os autores afirmam que, como o sinal químico é altamente sensível, é possível a discriminação visual dos resultados sem precisar de equipamentos especializados que custam caro. A empresa Eiken Chemical Company, Ltd. é líder atual em tecnologia LAMP (SAHARAN et al., 2014; EDWIN et al., 2014).

Alguns trabalhos já foram publicados utilizando esta técnica para determinar *Salmonella* em alguns alimentos, como o de YANG et al. (2015), WANG et al. (2008), contudo não houve uma comparação com os métodos tradicional e PCR. Visando realizar esta comparação entre os métodos e em diferentes matrizes, os objetivos deste trabalho foram avaliar a técnica de LAMP, comparando com a técnica de PCR e o método cultural para detectar *Salmonella* em diferentes matrizes.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Amostras

Foram adquiridas quatro matrizes de alimentos de diferentes marcas no mercado: molho para salada, cacau em pó, queijo ralado e pó para preparo de bolo. Para a realização do presente trabalho foi feita a padronização do inóculo no densitômetro, utilizando a escala Mac Farland. Os métodos testados foram o PCR e cultural.

### 2.2 Padronização do inóculo

A padronização do inóculo foi feita a partir da cepa de *Salmonella* Typhimurium (ATCC 14028). Fez-se uma estria da cepa em Ágar Nutriente (NA), e a mesma foi incubada à 35°C por 24 horas. Após o período de incubação foi retirada uma alçada da colônia, e colocada em um tubo com solução tampão fosfato (PB), realizando a leitura no densimat até atingir a escala (5,0).

Em seguida foram feitas diluições seriadas da suspensão até 10<sup>-8</sup> em água peptonada 0,1%. A partir do tubo 10<sup>-8</sup> foi transferido 0,3 mL em placas contendo Ágar Padrão para Contagem (PCA)



através da técnica de plaqueamento em superfície. As placas de PCA foram incubadas à 35°C por 24 horas. Após o período de incubação, foi feita a contagem da suspensão da *S. Typhimurium*.

### **2.3 Contaminação das amostras**

As amostras (25g) foram fortificadas com a cepa de *S. Typhimurium* em um nível baixo, variando de 1 a 4 células.

Foram realizadas as análises da amostra controle branco pelos dois métodos (sem contaminação).

### **2.4 Métodos para detecção de Salmonella**

#### **2.4.1 Método Cultural**

O pré-enriquecimento foi feito com uma porção de 25g ou 25 mL da amostra em 225 mL de Água Peptonada Tamponada (BPW), com período de incubação de 18±1h à 37°C. Após o tempo de incubação foi transferido 0,1 mL para 10 mL de Caldo Rappaport-Vassiladis Soja (RVS) e 1 mL para 10 mL de Caldo Tetrionato Muller Kauffmann Novobiocina (MKTTn). Os tubos foram incubados, sendo o Caldo RVS a 41,5±1°C por 24±3h e o Caldo MKTTn a 37±1°C por 24±3h.

Em seguida, de cada cultura em RVS foi estriado uma alçada em Ágar Xilose Lisina Dosoicolato (XLD), (incubada a uma temperatura de 37±1°C/24±3h) e uma alçada em Ágar Bismuto Sulfito (BS) (incubada a uma temperatura de 35±2°C/40-48h). O mesmo procedimento foi realizado para o caldo MKTTn.

Após o período de incubação foi observado o crescimento de colônias típicas de *Salmonella* nos meios de plaqueamento diferencial (XLD e BS), e realizada a confirmação de cultura, através de provas bioquímicas e sorológicas (ISO 6579, 2007).

#### **2.4.2 PCR**

Neste método o pré-enriquecimento foi feito com uma porção de 25g ou 25 mL da amostra em 225 mL de Água Peptonada Tamponada (BPW), com período de incubação de 18±2h à 37°C. O 2º pré-enriquecimento foi realizado adicionando 10 µL da amostra pré-enriquecida em 500 µL de Infusão Cérebro Coração (BHI). Os tubos foram incubados por 3 horas a 37±1°C.

Em seguida foram transferidos 5 µL de cada amostra enriquecida para os tubos de lise. Após a transferência seguiu-se para a reação de lise. Nesta etapa os tubos foram aquecidos à 37°C±2°C



por 20 minutos e, em seguida a  $95^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos. Após esta fase os tubos foram mantidos por 5 minutos em um bloco de resfriamento, enquanto foi preparada a transferência das amostras para os tubos de PCR.

Depois desta etapa foi colocado um tubo de PCR por amostra no suporte, contendo o tablete de reação essencial à análise, e em seguida os tabletes foram hidratados com 50  $\mu\text{L}$  da amostra lisada e resfriada. Em seguida, o bloco de resfriamento foi levado para o termociclador para a etapa de amplificação. O programa de processo completo de ciclagem e detecção levou cerca de três horas e meia. Os resultados foram visualizados no programa, considerando verde o resultado negativo e vermelho o positivo para o micro-organismo alvo (ISO 6579, 2007 e AOAC 2012).

#### 2.4.3 LAMP

O enriquecimento da amostra foi feito com Água Peptonada Tamponada (BPW), com período de incubação de 18-24h à  $37^{\circ}\text{C}$ . Após esse processo, foram transferidos 20  $\mu\text{L}$  da amostra enriquecida para o tubo de lise, invertendo o mesmo de 3 à 5 vezes, e em seguida os tubos foram aquecidos a  $100^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos. Logo após o aquecimento os tubos foram resfriados durante 10 minutos, invertidos de 3 à 5 vezes novamente, e colocados para descansar por 5 minutos.

Em seguida 20  $\mu\text{L}$  da amostra lisada foram transferidos para o tubo teste que contém os reagentes liofilizados. Os tubos foram inseridos no equipamento e os resultados foram expressos por cores, verde é negativo e vermelho positivo (ISO 6579, 2007 e KIT SALMONELLA 3M REF: HB004241921).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após os procedimentos realizados foi obtido o resultado final das análises de acordo com as Tabelas 1 a 4, referentes aos dois tipos de métodos utilizados até o momento (Cultural e PCR) para as quatro matrizes, molho para salada, cacau em pó, pó para preparo de bolo e queijo ralado respectivamente.



Tabela 1. Detecção de *Salmonella* – Molho para salada

<b>Amostras</b>	<b>UFC inoculadas em 25 mL</b>	<b>Cultural</b>	<b>PCR</b>	<b>LAMP</b>	<b>Controle negativo</b>
<b>1</b>	3,5	+	+	+	-
<b>2</b>	3,5	+	+	+	-
<b>3</b>	3,5	+	+	+	-
<b>4</b>	3,5	+	+	+	-
<b>5</b>	3,5	+	+	+	-

UFC = Unidades Formadoras de Colônias

Tabela 2. Detecção de *Salmonella* – Cacau em pó

<b>Amostras</b>	<b>UFC inoculadas em 25 g</b>	<b>Cultural</b>	<b>PCR</b>	<b>LAMP</b>	<b>Controle negativo</b>
<b>1</b>	3,5	+	+	+	-
<b>2</b>	3,5	+	+	+	-
<b>3</b>	3,5	+	+	+	-
<b>4</b>	3,5	+	+	+	-
<b>5</b>	3,5	+	+	+	-

UFC = Unidades Formadoras de Colônias

Tabela 3. Detecção de *Salmonella* – pó para preparo de bolo

<b>Amostras</b>	<b>UFC inoculadas em 25 g</b>	<b>Cultural</b>	<b>PCR</b>	<b>LAMP</b>	<b>Controle negativo</b>
<b>1</b>	4	+	+	+	-
<b>2</b>	4	+	+	+	-
<b>3</b>	4	+	+	+	-
<b>4</b>	4	+	+	+	-
<b>5</b>	4	+	+	+	-

UFC = Unidades Formadoras de Colônias



Tabela 4. Detecção de *Salmonella* – queijo ralado

Amostras	UFC inoculadas em 25 g	Cultural	PCR	LAMP	Controle negativo
1	4	+	+	+	-
2	4	+	+	+	-
3	4	+	+	+	-
4	4	+	+	+	-
5	4	+	+	+	-

UFC = Unidades Formadoras de Colônias

Dentre as técnicas para detecção de *Salmonella* testadas, cultural e PCR, ambas apresentaram concordância nos resultados e foram capazes de detectar o micro-organismo alvo utilizando níveis baixos de inoculação (<4UFC/25g).

A ausência da *Salmonella* como contaminante natural da amostra foi confirmada em todas as amostras, através da análise da amostra sem fortificação, que foram negativos.

#### 4. CONCLUSÃO

Todas as amostras inoculadas com nível baixo, (1-4 células) apresentaram concordância nos resultados para os três métodos testados.

Através da avaliação da técnica LAMP foi possível observar a eficiência e rapidez do método, quando comparado com a PCR e o método cultural.

#### 5. AGRADECIMENTOS

Ao CNPq – PIBIC pela bolsa concedida.

#### 6. REFERÊNCIAS

AOAC Official Method 2003.09 (*Salmonella* PCR Bax System). In: LATIMER JR., G.W. (ed.), **Official Methods of Analysis of AOAC International, 19<sup>th</sup> edition**. Gaithersburg, Maryland: AOAC International, 2012. Chapter 17, pp.205-210.



BRASIL, Ministério da Saúde. **Doenças transmitidas por alimentos (DTA)**. Dezembro 2016. Disponível em: <[www.saude.gov.br/svs](http://www.saude.gov.br/svs)>. Acesso em 03 de março de 2017.

EDWIN, S. et al. **Amplificación isotérmica mediada por LOOP (LAMP) de ácidos nucleicos en el diagnóstico clínico**. 30 jul. 2014. Disponível em: <[http://www.revistasbolivianas.org.bo/pdf/rcfb/v2n1/v2n1\\_a14.pdf](http://www.revistasbolivianas.org.bo/pdf/rcfb/v2n1/v2n1_a14.pdf)>. Acesso em 21 de agosto de 2016.

FLÔRES, M. L. et al. **Métodos de extração de DNA para a detecção de Salmonella em ovos de galinhas, com e sem casca, através da reação em cadeia pela polimerase**. Ciência Rural, Santa Maria, v.31, n.2, p.315-318, 2001.

SAHARAN P. et al. **Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) based detection of bacteria : A Review**. African Journal of Biotechnology, v.13 (19), p.1920-1928, 2014.

SHINOHARA, N. K. S. et al. **Salmonella spp., importante agente patogênico veiculado em alimentos**. Ciência & Saúde Coletiva, 13(5):1675-1683, 2008.

WANG, L. et al. **Specific and rapid detection of foodborne Salmonella by loop-mediated isothermal amplification method**. Food Research International, v.41, p.69-74, 2008.

YANG, Q. et al. **Evaluation of loop-mediated isothermal amplification for the rapid, reliable, and robust detection Salmonella in produce**. Food Microbiology, v. 46, p.485-493, 2015.