https://doi.org/10.22491/2357-9730.140116

Detecção dos sorotipos Enteritidis e Heidelberg de *Salmonella* por método de amplificação isotérmica de DNA

Detection of Salmonella Enteritidis and Heidelberg serotypes by isothermal DNA amplification method

Lucas Wolf[1], Jonas Wolf[2*]

RESUMO

Introdução: *Salmonella* é uma bactéria causadora de doenças transmitidas por alimentos (DTAs), normalmente devido à ingestão de alimen tos de origem animal. Métodos de análise de DNA são alternativas para a detecção direta de *Salmonella* e sorovares, com destaque para a amplificação isotérmica de DNA pela técnica de LAMP (*loop mediated isothermal amplification*). **Objetivo**: Estabelecer a detecção de *Salmonella* dos sorovares Enteritidis e Heidelberg pela técnica de LAMP. **Método**: Foi realizada a análise comparativa dos métodos com testes sorológico e molecular (PCR em tempo real) na avaliação de 40 isolados de nove sorovares importantes [sendo 14 (35%) de Enteritidis e 12 (30%) de Heidelberg obtidos do LACEN-RS. **Resultados**: Todos os quatorze isolados de Enteritidis e os doze de Heidelberg foram detectados pelos testes de PCR e LAMP específicos para cada sorovar. **Conclusão**: A análise comparativa demonstrou total concordância entre PCR e LAMP, indicando um bom desempenho analítico do método de LAMP.

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

ABSTRACT

Introduction: Salmonella is a bacterium that causes foodborne illnesses (FBIs), usually due to the ingestion of foods of animal origin. DNA analysis methods are alternatives for the direct detection of Salmonella and serotypes, with emphasis on the isothermal amplification of DNA using the LAMP technique (loop mediated isothermal amplification). **Aim**: To establish the detection of *Salmonella* serotypes Enteritidis and Heidelberg by the LAMP technique. **Methods**: A comparative analysis of the methods with serological and molecular tests (real-time PCR) was carried out in the evaluation of 40 isolates of nine important serotypes [14 (35%) of Enteritidis and 12 (30%) of Heidelberg] obtained from LACEN- LOL. **Results**: All fourteen Enteritidis isolates and the twelve Heidelberg isolates were detected by serovar-specific PCR and LAMP tests. **Conclusion**: Comparative analysis demonstrated full agreement between PCR and LAMP, indicating excellent analytical performance of the LAMP methods.

Keywords: *Salmonella; Enteritidis; Heidelberg; LAMP; PCR.*

Clin Biomed Res. 2025;45:1-6

1 Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil.

2 Escritório de Gestão da Prática Clínica e Valor em Saúde, Gerência Médica, Hospital Moinhos de Vento, Porto Alegre, RS, Brasil.

Autor correspondente:
Jonas Wolf
R. Ramiro Barcelos, 910
CEP: 90035-000- Moinhos de Vento, Porto Alegre, RS – Brasil
Telefone: (51) 991433510
e-mail: jonas.wolf@hmv.org.br

INTRODUÇÃO

Salmonella é um dos principais agentes bacterianos com capacidade de causar doenças pelo consumo de produtos de origem animal, tais como ovos e carnes.[1] 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.[2]

O gênero *Salmonella* é classificado em duas espécies: *S. enterica* e *S. bongori*.[3] No entanto, a principal classificação é por sorovares, sendo

CC BY

demonstrados mais de 2.600 variantes antigênicas.[4,5] As denominações dos sorovares e as respectivas fórmulas antigênicas estão listadas no documento *Kauffmann-White-Le Minor* (KWL).[4,6]

A detecção específica de sorovares 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 sorovares.[7] Mais recentemente, novas técnicas moleculares foram desenvolvidas para detecção de sorovares específicos, entre as quais a amplificação isotérmica de DNA por LAMP (do inglês, *loop mediated isothermal amplification*).[8] 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.[9] Neste aspecto, ensaios de LAMP podem ser realizados em termoblocos simples, sem necessidade de termocicladores como na PCR.[10]

Dentre os mais de 2600 sorotipos existentes de *Salmonella*, *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Heidelberg são sorotipos predominantes em alimentos, especialmente de alimentos oriundos de produtos avícolas como ovos e carne de frango, devido à sua capacidade de colonizar aves de forma assintomática, o que facilita a disseminação dentro dos lotes e a contaminação dos produtos finais durante o processamento.[2] Nesse ínterim, o presente estudo objetivou estabelecer a detecção dos sorovares 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 foram previamente caracterizados a partir de ensaios sorológicos[4,5], sendo classificados pelos seguintes sorovares: Enteritidis (n = 14; 35,0%), Typhimurium (n = 8; 20,0%), Heidelberg (n = 12; 30,0%), 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 *Rapapport-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 ºC 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.[11-13]

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).[11,13]

Sorotipagem

Os sorovares foram classificados com base no procedimento de KWL.[13] 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 (Thermo Fisher Scientific ™). Atualmente este método emprega mais de 150 antissoros O e H para a caracterização dos sorovares 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.[11,13]

Detecção molecular

O método utilizado para a realização da extração foi o de adsorção do DNA em sílica.[14] 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*)[15,16] e Heidelberg (gene *ACF69659*)[15], tendo a avaliação a olho nu dos resultados por análise colorimétrica e confirmação dos mesmos por eletroforese em gel de poliacrilamida (**Figura 1**). As condições utilizadas nos ensaios de LAMP foram um ciclo de 65 °C por 40 min e um ciclo de 80 C° por 5 min. Para a confirmação dos resultados foi realizada eletroforese em gel de poliacrilamida, utilizando uma voltagem de 100V e corrente de 45 mA, por 40 minutos.[17,18]

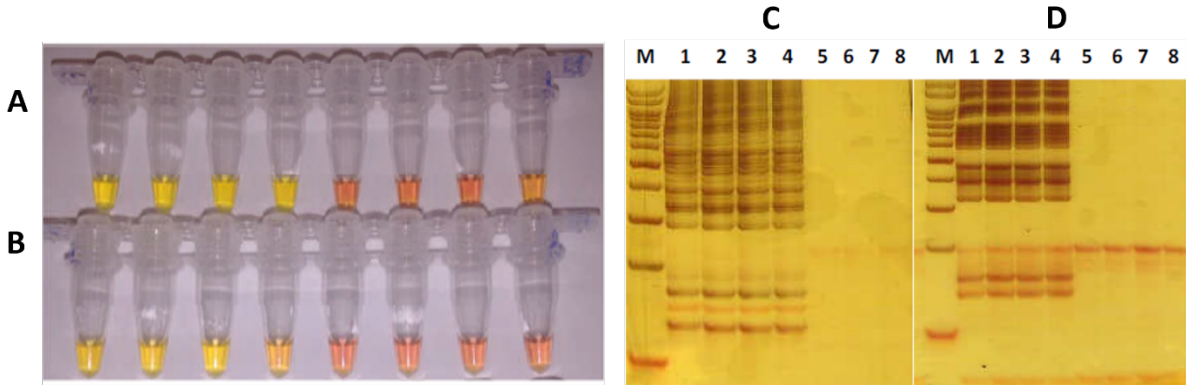


Figura 1: Fotografia dos tubos após a amplificação por LAMP para *S.* Enteritidis (A) e *S*. Heidelberg (B) e resultado da eletroforese em gel de poliacrilamida para *S*. Enteritidis (C) e para *S*. Heidelberg (D).

De forma confirmatória, foram efetuados os ensaios com a técnica de PCR em tempo real no equipamento *StepOne Plus* (*Applied Biosystems*, Carlsbad CA, EUA). Os primers utilizados nos ensaios moleculares (LAMP e PCR em tempo real), assim como as referências bibliográficas dos mesmos estão apresentados na **Tabela Suplementar 1**. 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.[16] 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

Na realização dos experimentos em que foram utilizados testes moleculares (PCR e LAMP), 14 amostras (35%) resultaram em positivo para Enteritidis e 26 (65%) em negativo. Nas análises moleculares a detecção foi específica para o sorovar Enteritidis (gene *safA*), porém, duas amostras (5%) previamente sorotipadas como Typhimurium nos ensaios sorológicos, apresentaram resultados positivos para o sorovar Enteritidis nos ensaios moleculares. Tal incongruência entre os resultados obtidos para estas duas amostras pode ser oriundo de algum tipo de contaminação cruzada nas análises moleculares, uma vez que os sorovares Enteritidis e Typhimurium apresentam antígenos somáticos distintos, o que foi observado na análise sorológica prévia.

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

Além disso, seis amostras (15%) que resultaram em positivo para outros sorovares (Braenderup, Infantis, Panama, entre outros) nas análises sorológicas, demonstraram resultados negativos nos ensaios de LAMP e PCR (**Tabela 1**).

Tabela 1: Resultados de PCR e LAMP para a detecção dos sorovares *S*.Enteritidis e *S*.Heidelberg.

Sorovares	n	%	Resultados moleculares			
			PCR *S*.Enteritidis	PCR *S*.Heidelberg	LAMP *S*.Enteritidis	LAMP *S*.Heidelberg
Enteritidis	14	35,0	+	-	+	-
Heidelberg	12	30,0	-	+	-	+
Typhimurium	8	20,0	- (2+)	-	- (2+)	-
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 capacidade de análise dos resultados, assim como observado por estudos anteriores que também utilizaram a técnica de LAMP para realizar a detecção rápida de diferentes agentes patogênicos de origem alimentar e outros contaminantes microbianos.[9,19,20]

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.[21] Neste sentido, as aplicações moleculares que visam à análise de DNA configuram-se como alternativas às metodologias tradicionais de sorotipagens de salmonelas.[10,22,23]

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[9,10,20] 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.

Autoria

Lucas Wolf projetou e implementou o estudo. Jonas Wolf realizou as análises estatísticas. Lucas Wolf e Jonas Wolf escreveram a primeira versão do manuscrito e contribuíram com a revisão da literatura e discussão dos resultados.

Financiamento

Esta pesquisa não recebeu nenhum subsídio específico de agências de financiamento nos setores público, comercial ou sem fins lucrativos.

Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

Agradecimentos

Os autores agradecem à equipe do Laboratório de Diagnóstico Molecular da Universidade Luterana do Brasil (LDM-ULBRA) que realizou suporte técnico.

Declaração de disponibilidade de dados

Os dados que apoiam as descobertas deste estudo estão disponíveis com o autor correspondente mediante solicitação razoável.

REFERÊNCIAS

1. Schroeder CM, Latimer HK, Schlosser WD, Golden NJ, Marks HM, Coleman ME, Hogue AT, Ebel ED, Quiring NM, Kadry AR, Kause J. Overview and summary of the Food Safety and Inspection Service risk assessment for Salmonella enteritidis in shell eggs, October 2005. Foodborne Pathog Dis. 2006;3(4):403-12.
2. Majowicz SE, Musto J, Scallan E, Angulo FJ, Kirk M, O'Brien SJ, Jones TF, Fazil A, Hoekstra RM; International Collaboration on Enteric Disease 'Burden of Illness' Studies. The global burden of nontyphoidal Salmonella gastroenteritis. Clin Infect Dis. 2010;50(6):882-9.
3. CDC. National Salmonella Surveillance Overview. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services, CDC, 2011. Disponível em: http://www.cdc.gov/nationalsurveillance/PDFs/NationalSalmSurveilOverview_508.pdf. Acesso em: maio de 2023.
4. Grimont PAD, Weill F. Antigenic Formulae of the Salmonella Serovars. 9a ed. Paris: WHO Collaborating Center for Reference and Research on Salmonella. Paris: Institut Pasteur, 2007.
5. Guibourdenche M, Roggentin P, Mikoleit M, Fields PI, Bockemühl J, Grimont PA, Weill FX. Supplement 2003-2007 (No. 47) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. Res Microbiol. 2010;161(1):26-9.
6. Issenhuth-Jeanjean S, Roggentin P, Mikoleit M, Guibourdenche M, de Pinna E, Nair S, Fields PI, Weill FX. Supplement 2008-2010 (no. 48) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. Res Microbiol. 2014;165(7):526-30.

7. 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.

8. Hu, L., Ma, L. M., Zheng, S., He, X., Hammack, T. S., Brown, E. W., & Zhang, G. Development of a novel loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the detection of Salmonella ser. Enteritidis from egg products. Food Control. 2018. (88): 190-197.

9. Yang Q, Chen S, Ge B. Detecting Salmonella serovars in shell eggs by loop-mediated isothermal amplification. J Food Prot. 2013;76(10):1790-6.

10. Yang JL, Ma GP, Yang R, Yang SQ, Fu LZ, Cheng AC, Wang MS, Zhang SH, Shen KF, Jia RY, Deng SX, Xu ZY. Simple and rapid detection of Salmonella serovar Enteritidis under field conditions by loop-mediated isothermal amplification. J Appl Microbiol. 2010;109(5):1715-23.

11. Barrow, P. A. (2000). Serological diagnosis of Salmonella by ELISA and other tests.

12. Hossain, M. S., Chowdhury, E. H., Islam, M. M., Haider, M. G., & Hossain, M. M. (2006). Avian Salmonella infection: isolation and identification of organisms and histopathological study. Bangladesh Journal of Veterinary Medicine, 4(1), 7-12.

13. Waltman, W. D. (2000). Methods for the cultural isolation of Salmonella. Salmonella in domestic animals, 355-372.

14. Soumet, C., Ermel, G., Fach, P., & Colin, P. (1994). Evaluation of different DNA extraction procedures for the detection of Salmonella from chicken products by polymerase chain reaction. Letters in Applied Microbiology, 19(5), 294-298.

15. Andrade, C. F. D. S., Souza, M. N., Dantas, I. I. D. S., Fonseca, A. S. K., Ikuta, N., Kipper, D., & Lunge, V. R. (2024). Salmonella enterica Enteritidis and Heidelberg serotype-specific molecular detection in poultry samples by a rapid isothermal method. British Poultry Science, 1-7.

16. Souza, M. N., Lehmann, F. K. M., De Carli, S., Kipper, D., Fonseca, A. S. K., Ikuta, N., & Lunge, V. R. (2019). Molecular detection of Salmonella serovars Enteritidis, Heidelberg and Typhimurium directly from pre-enriched poultry samples. British poultry science, 60(4), 388-394.

17. Alcocer, I., Oliveira, K. M. P. D., Vidotto, M. C., & de Oliveira, T. C. R. (2006). Discriminação de sorovares de Salmonella spp. isolados de carcaças de frango por REP e ERIC-PCR e fagotipagem do sorovar Enteriditis. Food Science and Technology, 26, 414-420.

18. De Camargo Sampaio, L. Avaliação da viabilidade técnica e operacional de detecção rápida de Salmonella.

19. 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. 2016 Feb 13;6(4):522-32. doi: 10.7150/thno.14391. PMID: 26941845; PMCID: PMC4775862.

20. Ueda S, Kuwabara Y. The rapid detection of Salmonella from food samples by loop-mediated isothermal amplification (LAMP). Biocontrol Sci. 2009;14(2):73-6.

21. Maurischat, S., B. Baumann, A. Martin, and B. Malorny. 2015. “Rapid Detection and Specific Differentiation of Salmonella Enterica Subsp Enterica Enteritidis, Typhimurium and Its Monophasic Variant 4, 5,12:I: - by Real-Time Multiplex PCR.” International Journal of Food Microbiology 193: 8–14. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2014.10.004.

22. Park, S. H., and S. C. Ricke. 2014. “Development of Multiplex PCR Assay for Simultaneous Detection of Salmonella Genus, Salmonella Subspecies I, Salm. Enteritidis, Salm. Heidelberg and Salm. Typhimurium.” Journal of Applied Microbiology 118: 152–160. doi:10.1111/jam.12678.

23. Wattiau P, Boland C, Bertrand S. Methodologies for Salmonella enterica subsp. enterica subtyping: gold standards and alternatives. Appl Environ Microbiol. 2011;77(22):7877-85.

Submetido: 09 mai 2024
Aprovado: 10 junho 2025

Tabela Suplementar 1: Primers utilizados nos ensaios moleculares (PCR em tempo real e LAMP) para detecção de *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Heidelberg.

Patógeno	Primer/ Sonda	Sequencia (5'-3')	Técnica Molecular	Referências
Salmonella Enteritidis (*safA*)	Forward	GGTTGCTAACACGACACTG	PCR em tempo real	Maurischat et al., 2015
	Reverse	TGGGGCATTGGTATCAAAG		
	Sonda	FAM-CTCCTCCCATTCCACATTTGCG-ZEN-IOWABLACK FQ		
Salmonella Heidelberg (*ACF69659*)	Forward	TGTTTGGAGCATCATCAGAA	PCR em tempo real	Park and Ricke 2014; Souza et al., 2019
	Reverse	GCTCAACATAAGGGAAGCAA		
	Sonda	FAM–AAACATCCGCCCGCCCTGTT–ZEN-IOWABLACK FQ		
Salmonella Enteritidis (*safA*)	F3	TGCTGGTAGTGCATGGAA	LAMP	Andrade et al., 2024
	B3	AGTTATTGGGTACGTATCAGG		
	FIP	GCCATGACCTCTGCTCATATTATTATGGTAAAAATAGTGGCACGAT		
	BIP	GAGCTGGTTCACCTTTGATACGGATATTCTGAGCCCCTAT		
	LF	TTTGAGAAGCCCACAGTGAGT		
	LB	CAATGCCCCACTTGATATTGTTACA		
Salmonella Heidelberg (*ACF69659*)	F3	TCTAGCATAGTTCCAAAGCA	LAMP	Andrade et al., 2024
	B3	GACCAGCATAATCTTTCGTT		
	FIP	CAGCCACTATTGAATGACAAAATGCCACCCTGTACTCTCAACGA		
	BIP	GGCGGGCGGATGTTTATGAA-CTAATGCTCTTGAGTTTGCA		
	LF	AGCTTAGCAGGCTTTTTGGC		
	LB	GCTTCCCTTATGTTGAGCTAATGAG		