



11º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2017
02 a 04 de agosto de 2017 – Campinas, São Paulo
ISBN 978-85-7029-141-7

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

Bruna Letícia Moura **Carneiro**¹; Fabiana Taminato **Imazaki**²; Adriane Narumi Onodera **Andrade**³;
Margarete Midori **Okazaki**⁴; Beatriz Thie **Iamanaka**⁵

Nº 17237

RESUMO – A *Salmonella* é uma bactéria entérica patogênica e é considerado um dos principais agentes responsáveis por doenças de origem alimentar. Considerando os diversos casos de infecção alimentar e a necessidade de se obter um diagnóstico rápido e eficiente, novas técnicas estão sendo desenvolvidas para a detecção deste micro-organismo em alimentos. A técnica de LAMP (Loop- Mediated Isothermal Amplification of DNA) é capaz de amplificar os ácidos nucleicos de forma específica, rápida e sob condições isotérmicas, e tem sido utilizada como um método alternativo para detecção de patógenos em alimentos. O objetivo deste projeto foi avaliar a técnica de LAMP em comparação com a técnica de PCR e o método cultural para a detecção de *Salmonella* em diferentes matrizes: suco de laranja, leite, salada pronta para consumo, pimenta do reino, páprica doce, pasta de amendoim e chocolate. As amostras foram inoculadas com a cepa de *S. Typhimurium* (ATCC14028), em níveis baixos, que variaram de 4-22 células em 25 mL ou g da amostra.

Palavras-chaves: *Salmonella* spp., Infecção alimentar, LAMP.

1 Autor, Bolsista CNPq (PIBIC): Graduação em Ciências Biomédicas, METROCAMP, Campinas-SP; bruu.moura@outlook.com

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

3 Colaborador: Estagiária do laboratório de Microbiologia do Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas, SP

4 Co-orientador: Pesquisador, Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas, SP

5 Orientador: Pesquisador, Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas, SP



11º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2017
02 a 04 de agosto de 2017 – Campinas, São Paulo
ISBN 978-85-7029-141-7

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: orange juice, milk, ready-to-eat salad, black pepper, sweet paprika, peanut butter paste and chocolate. Samples were inoculated with *S. Typhimurium* strain (ATCC14028), at low levels, ranging from 4-22 cells in 25 ml or g of the sample.

Keywords: *Salmonella* spp., Food poisoning, LAMP.

1 INTRODUÇÃO

Os alimentos são susceptíveis a diversos tipos de contaminação microbiológica, uma vez que os mesmos podem passar por várias etapas de manuseio, transporte, processamento e armazenamento até o seu consumo.

No Brasil, foram notificados 6.848 surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) no período de 2007-2016, dentre os quais 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, 2016).

A *Salmonella* spp. é uma bactéria entérica que está associada com doenças transmitidas por alimentos, e é responsável por infecções 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 pelo método ideal para o diagnóstico de *Salmonella* em alimentos, animais e homem iniciou-se a partir do momento em que este micro-organismo foi descrito como um agente patogênico, e permanece até os dias de hoje. Dentre as pesquisas realizadas, várias alternativas vem sendo aplicadas tais como os imunoenaios, imunodifusão, aglutinação em látex e hibridização do DNA (FLÔRES et al., 2001). Normalmente para se fazer o isolamento e caracterização de micro-



11º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2017
02 a 04 de agosto de 2017 – Campinas, São Paulo
ISBN 978-85-7029-141-7

organismos 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, os avanços da biologia molecular têm proporcionado novas áreas de estudo de 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. Essa técnica, desenvolvida por uma equipe da Universidade de Tóquio, no Japão e publicada no ano de 2000, tem como finalidade amplificar os ácidos nucléicos 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 a necessidade de equipamentos especializados que custam caro (SAHARAN et al., 2014; EDWIN et al., 2014).

Alguns trabalhos já foram publicados utilizando esta técnica para determinar *Salmonella* em alguns alimentos, 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 matrizes.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostras

Para a realização do presente trabalho, foram adquiridos sete tipos de alimentos de diferentes marcas e matrizes: suco pasteurizado de laranja, leite UHT, salada pronta para consumo, pimenta do reino, páprica doce, pasta de amendoim e chocolate.

2.2 Padronização do inóculo

A padronização do inóculo foi realizada a partir da cepa de *Salmonella* Typhimurium (ATCC14028). 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 uma alçada da massa celular foi transferida para um tubo contendo solução tampão fosfato (PB) para a realização da padronização da densidade na escala 5,0 Mac Farland.



11º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2017
02 a 04 de agosto de 2017 – Campinas, São Paulo
ISBN 978-85-7029-141-7

Em seguida foram preparadas e plaqueadas diluições decimais seriadas (até 10^{-8}), utilizando-se água peptonada 0,1% como diluente. O plaqueamento foi realizado com o meio Ágar Padrão para Contagem (PCA) através da técnica de inoculação em profundidade. A enumeração do inóculo na suspensão padronizada (UFC/mL) foi realizada após 24h/35°C de incubação das placas.

2.3 Contaminações das amostras

As amostras (25g) foram fortificadas com a cepa de *S. Typhimurium* em níveis baixos, que variaram de 4 a 22 células.

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

2.4 Métodos para detecção de *Salmonella*

2.4.1 Método do número mais provável (NMP)

A técnica do número mais provável foi utilizada para a confirmação do número de células inoculadas na amostra. Nesta técnica, foi avaliada a combinação de tubos positivos e negativos, e através de cálculos estimou-se a densidade do micro-organismo alvo na amostra.

Para análise de amostra líquida foram realizados os seguintes procedimentos: em 25 mL de amostra foi adicionado um volume apropriado da suspensão diluída contendo *Salmonella*. Após homogeneização, foram distribuídos 5 mL da amostra em 5 tubos e em seguida, acrescentados em cada tubo 5 mL de Água Peptonada Tamponada (BPW) em dupla concentração. Os tubos foram incubados à 37°C por 24 horas.

Para análise com amostra sólida foram realizados os seguintes procedimentos: em 25g de amostra foi adicionado um volume apropriado da suspensão diluída contendo *Salmonella*. Após homogeneização, foram colocados 225 mL de BPW, e logo em seguida foi distribuído, uniformemente o volume total da água de lavagem da amostra em 5 frascos. Os frascos foram incubados à 37°C por 24 horas.

Após o período de incubação, as amostras foram estriadas em Ágar Xilose Lisina Desoxicolato - XLD (incubadas a uma temperatura de $37\pm 1^\circ\text{C}/24\pm 3\text{h}$). Em seguida foi observado o crescimento de colônias típicas de *Salmonella*, determinando assim o NMP de cada amostra (SILVA et al., 2010).



2.4.2 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 ± 1 h à 37°C . Após o tempo de incubação foi transferido 0,1 mL para 10 mL de Caldo Rappaport-Vassiladis Soja (RVS) e 1mL para 10 mL de Caldo Tetrionato Muller Kauffmann Novobiocina (MKTTn). Os tubos foram incubados, sendo o Caldo RVS a $41,5\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 ± 3 h e o Caldo MKTTn a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 ± 3 h.

Em seguida, de cada cultura em RVS foi estriado uma alçada em Ágar Xilose Lisina Desoxicolato (XLD), (incubada a uma temperatura de $37\pm 1^{\circ}\text{C}/24\pm 3$ h) e uma alçada em Ágar Bismuto Sulfito (BS) (incubada a uma temperatura de $35\pm 2^{\circ}\text{C}/40-48$ h). 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).

2.4.3 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 ± 2 h 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 $37\pm 1^{\circ}\text{C}$.

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 $37^{\circ}\text{C}\pm 2\text{C}$ 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 μL da amostra lisada e resfriada. Em seguida, o bloco de resfriamento foi levado para o termociclador para a etapa de amplificação. 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).



2.4.4 LAMP

O enriquecimento da amostra foi feito com Água Peptonada Tamponada (BPW), com período de incubação de 18-24h à 37°C. Após esse processo, foram transferidos 20 µL 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°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 µL 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

As tabelas de 1 a 7 apresentam os resultados de detecção de *Salmonella* obtidos para os três métodos de análise testados (Método cultural, LAMP e PCR), nas sete matrizes testadas, suco pasteurizado de laranja, leite UHT, salada pronta para consumo, pimenta do reino, páprica doce, pasta de amendoim e chocolate, respectivamente.

Tabela 1. Detecção de *Salmonella* - Suco de laranja pasteurizado

Amostras	UFC Inoculadas em 25 mL	NMP/25mL	Cultural	LAMP	PCR	Controle Negativo
1	4	2,6	+	+	+	-
2	16	> 8,1	+	+	+	-
3	16	4,6	+	+	+	-
4	16	4,6	+	+	+	-
5	16	> 8,0	+	+	+	-

UFC = Unidades Formadoras de Colônias

NMP = Número Mais Provável



11º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2017
02 a 04 de agosto de 2017 – Campinas, São Paulo
ISBN 978-85-7029-141-7

Tabela 2. Detecção de *Salmonella* – Leite esterilizado UHT

Amostras	UFC Inoculadas em 25 mL	NMP/25mL*	Cultural	LAMP	PCR	Controle Negativo
1	22	> 8,1	+	+	+	-
2	22	> 8,1	+	+	+	-
3	22	> 8,1	+	+	+	-
4	22	> 8,1	+	+	+	-
5	22	> 8,1	+	+	+	-

UFC = Unidades Formadoras de Colônias

NMP = Número Mais Provável

*Média de duas repetições

Tabela 3. Detecção de *Salmonella* - Salada pronta para consumo

Amostras	UFC Inoculadas em 25 mL	NMP/25mL*	Cultural	LAMP	PCR	Controle Negativo
1	6	> 6,3	+	+	+	-
2	6	> 7,9	+	+	+	-
3	6	4,5	+	+	+	-
4	6	> 8,1	+	+	+	-
5	6	> 6,3	+	+	+	-

UFC = Unidades Formadoras de Colônias

NMP = Número Mais Provável

*Média de duas repetições



11º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2017
02 a 04 de agosto de 2017 – Campinas, São Paulo
ISBN 978-85-7029-141-7

Tabela 4. Detecção de *Salmonella* – Pimenta do reino

Amostras	UFC Inoculadas em 25 mL	NMP/25mL*	Cultural	LAMP	PCR	Controle Negativo
1	4,5	> 8,0	+	+	+	-
2	4,5	> 8,1	+	+	+	-
3	4,5	> 8,1	+	+	+	-
4	4,5	> 8,0	+	+	+	-
5	4,5	7,9	+	+	+	-

UFC = Unidades Formadoras de Colônias

NMP = Número Mais Provável

*Média de duas repetições

Tabela 5. Detecção de *Salmonella* – Páprica doce

Amostras	UFC Inoculadas em 25 mL	NMP/25mL*	Cultural	LAMP	PCR	Controle Negativo
1	6,5	> 7,9	+	+	+	-
2	6,5	> 8,0	+	+	+	-
3	6,5	> 7,9	+	+	+	-
4	6,5	> 8,0	+	+	+	-
5	6,5	> 8,0	+	+	+	-

UFC = Unidades Formadoras de Colônias

NMP = Número Mais Provável

*Média de duas repetições



Tabela 6. Detecção de *Salmonella* – Pasta de amendoim

Amostras	UFC Inoculadas em 25 mL	NMP/25mL*	Cultural	LAMP	PCR	Controle Negativo
1	11	7,9	+	+	+	-
2	11	> 7,8	+	+	+	-
3	11	6,1	+	+	+	-
4	11	> 7,8	+	+	+	-
5	11	> 7,8	+	+	+	-

UFC = Unidades Formadoras de Colônias

NMP = Número Mais Provável

*Média de duas repetições

Tabela 7. Detecção de *Salmonella* – Chocolate

Amostras	UFC Inoculadas em 25 mL	NMP/25mL*	Cultural	LAMP	PCR	Controle Negativo
1	5,7	> 8,0	+	+	+	-
2	5,7	> 8,0	+	+	+	-
3	5,7	> 8,0	+	+	+	-
4	5,7	> 8,0	+	+	+	-
5	5,7	> 8,0	+	+	+	-

UFC = Unidades Formadoras de Colônias

NMP = Número Mais Provável

*Média de duas repetições

Dentre as técnicas para detecção de *Salmonella* testadas, cultural, LAMP e PCR, todas apresentaram concordância nos resultados e foram capazes de detectar o micro-organismo alvo utilizando níveis baixos de inoculação.

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.

Em relação à quantidade de colônias adicionada nas amostras, foi possível verificar que houve concordância entre o número de colônias inoculadas e a quantificação na amostra pela técnica do número mais provável. Na tabela 1, que apresenta os resultados do suco de laranja pasteurizado, é possível verificar uma diferença no número do inoculado entre a amostra 1 e as



11º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2017
02 a 04 de agosto de 2017 – Campinas, São Paulo
ISBN 978-85-7029-141-7

demais. Neste caso, para a amostra 1 foi utilizado nível de inóculo diferenciado, e a contagem em meio PCA foi menor (4UFC/25mL).

Os resultados da contagem da *Salmonella* pela técnica do número mais provável variaram de 2,6 a > 8,1 células em 25 mL ou g da amostra. Comparando estes resultados com os níveis de inóculo obtidos após o plaqueamento da *Salmonella* em meio PCA, foi possível observar boa correlação entre os resultados.

De acordo com os resultados obtidos, verificou-se que o método de LAMP apresentou alta sensibilidade, uma vez que foi capaz de detectar baixos níveis de contaminação (4-22 células) nas diferentes matrizes testadas.

Estes dados estão de acordo com o trabalho de Zhang et al. (2011), que desenvolveram um ensaio baseado na detecção do gene fim Y e leitura em tempo real em turbidímetro, para determinar a sensibilidade dos métodos LAMP e PCR. Para esse estudo estes autores utilizaram 80 cepas de *Salmonella* de diferentes sorotipos, isolados a partir de diversos tipos de alimentos e o limite de detecção do método foi de 13 células para técnica LAMP, em uma hora de reação e 130 células para PCR. O ensaio LAMP foi capaz de detectar *Salmonella*, mesmo a amostra sendo contaminada com uma concentração baixa.

Yang et al. (2010), desenharam um conjunto de seis iniciadores específicos com *S. Enteritidis* com DNA alvo, e compararam a sensibilidade e especificidade de LAMP com a reação em cadeia polimerase em tempo real (FQ-PCR). O DNA foi amplificado à 65°C em 20 minutos, emitindo uma cor visível a olho nu indicando uma reação positiva de amplificação. O limite de detecção do ensaio LAMP foi de quatro cópias, sendo esses resultados semelhantes à dos FQ-PCR. Através desse estudo, os autores concluíram que a LAMP é uma técnica que possui uma alta capacidade de detecção, sensibilidade, especificidade, simplicidade e é um método mais rápido para detecção de patógenos do que PCR e FQ-PCR, que requerem pelo menos de 2-3 horas para detecção.

No estudo realizado no Laboratório de Microbiologia do ITAL, o tempo para a detecção de *Salmonella* pela técnica LAMP foi de 15 a 75 minutos, enquanto a PCR levou cerca de 3 horas e meia e o método cultural cinco dias para fornecer os resultados. Mostrando que a técnica de LAMP apresenta maior rapidez, além da simplicidade e efetividade. De acordo com Edwin et al (2014), a técnica LAMP fornece os resultados entre 15 a 60 minutos.

Sendo assim, foi possível verificar que a técnica LAMP apresenta algumas vantagens comparada às outras técnicas testadas, destacando-se a simplicidade do método e a rapidez para a saída dos resultados.



11º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2017
02 a 04 de agosto de 2017 – Campinas, São Paulo
ISBN 978-85-7029-141-7

4 CONCLUSÃO

Todas as amostras inoculadas com nível baixo, (4-22 células) apresentaram concordância nos resultados para os três métodos testados. O método de LAMP apresentou coincidência com o método cultural e PCR para as seis matrizes testadas.

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

Portanto, a partir dos resultados obtidos neste trabalho, a técnica LAMP pode ser considerada uma boa alternativa para se utilizar nas indústrias e laboratórios de pesquisas, pois possui alta sensibilidade, especificidade, rapidez e simplicidade.

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, 19th 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>. Acesso em 03 de março de 2017.

EDWIN, S. et al. **Amplificación isotérmica mediada por LOOP (LAMP) de ácidos nucleicos en el diagnóstico clínico**. Revista Con-ciencia N°1/Vol. 2, 125-138, 2014.

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.

ISO 6579. **Microbiology of food and animal feeding stuffs –Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp. 4thed**. The International Organization for Standardization, 2002, Corrigendum 1:2004, Amendment 1:2007.

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.

SILVA, N. et al. **Manual de métodos de análise Microbiológica de Alimentos e água**. 4. Ed. – São Paulo : Livraria Varela, 2010.

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.



11º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2017
02 a 04 de agosto de 2017 – Campinas, São Paulo
ISBN 978-85-7029-141-7

YANG, J. L. et al. **Simple and rapid detection of *Salmonella* serovar Enteritidis under field conditions by loop-mediated isothermal amplification.** *Journal of Applied Microbiology* 109, 1715–1723, 2010.

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.