



Detecção de células viáveis de patógenos em queijo Minas Padrão pela técnica de PCR em Tempo Real¹

Juliana França Monteiro de Mendonça², Felipe de Oliveira Vieira³, Isabela Fonseca⁴, Edna Froeder Arcuri⁵, João Batista Ribeiro⁵, Maria de Fatima Borges⁶, Marta Fonseca Martins⁵

¹ Trabalho de dissertação do primeiro autor financiado pelo convênio Embrapa/Monsanto.

² Estudante de Mestrado, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz e Fora/MG. E-mail: julianafmm@yahoo.com.br

³ Estudante de Iniciação Científica CNPq, Centro de Ensino Superior Juiz de Fora, Juiz de Fora/MG

⁴ Bolsista de Pós-doutorado CNPq, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora/MG

⁵ Pesquisadores, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora/MG

⁶ Pesquisadora, Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza/CE

Resumo: Leite e derivados são alimentos altamente nutritivos e, portanto, suscetíveis ao desenvolvimento de micro-organismos patogênicos. As técnicas “padrão ouro” para detecção de patógenos em alimentos são demoradas e laboriosas. As moleculares, por sua vez, são rápidas, sensíveis e específicas, porém incapazes de diferenciar o DNA de micro-organismos viáveis e inviáveis. O Brometo de Etídio Monoazida (EMA) pode penetrar em células inviáveis e ligar-se ao seu DNA, impedindo sua amplificação durante a PCR em Tempo Real (qPCR). O objetivo desse trabalho foi estabelecer um protocolo utilizando EMA combinado a qPCR para detecção de células viáveis de *Salmonella* spp. em amostras de queijo Minas Padrão. Foram adicionados 50 µg/mL de EMA às amostras viáveis e inviáveis. As mesmas foram incubadas no escuro por 5 minutos a 4°C e, em seguida, expostas à luz halógena por 5 minutos em cuba de gelo a 20 centímetros de distância da fonte de luz. Foi observada uma diferença de 8 ciclos de amplificação entre as amostras inviáveis tratadas ou não com EMA ($p < 0,05$). Já para as amostras viáveis, não foi observada diferença estatística entre ciclos de amplificação ($p < 0,05$). O EMASR calculado foi 0,71 e 0,06 para amostras viáveis e inviáveis respectivamente, representando uma diminuição de 12 vezes em seu valor. Esse resultado indica que o protocolo desenvolvido usando EMA-qPCR é eficiente para diferenciar células viáveis e inviáveis de *Salmonella* spp. em queijo Minas Padrão nas condições testadas.

Palavras-chave: EMA, micro-organismos patogênicos, derivados lácteos, qPCR, viabilidade

Detection of viable pathogens in Minas Padrão cheese by Real-Time PCR technique

Abstract: Milk and milk products are highly nutritious and therefore susceptible to the development of pathogenic microorganisms. The “gold standard” techniques for detection of pathogens in food are time consuming and laborious. The molecular, in turn, are quick, sensitive and specific. However, they are unable to differentiate the DNA of viable and non-viable microorganisms. The Ethidium Monoazide Bromide (EMA) may penetrate dead cells and bind to DNA, hence inhibiting the amplification during Real-Time PCR (qPCR). The aim of this work was establish a protocol using EMA combined with qPCR to detect viable cells of *Salmonella* spp. in Minas Padrão cheese samples. EMA (50 µg/mL) was added to viable and dead samples. The samples were incubated in the dark for 5 minutes at 4°C and, then, exposed to halogen light for 5 minutes under ice cubes and 20 cm distance from the light source. It was observed a difference of 8 amplification cycles between the samples treated or not with viable EMA ($p < 0,05$). While for viable samples there was no statistical difference between amplification cycles ($p < 0,05$). The EMASR calculated was 0,71 and 0,06 to viable and non-viable samples, respectively, representing a decrease (or reduction) of 12 times in its value. This result indicates that the protocol using EMA-qPCR is efficient to differentiate viable and dead cells of *Salmonella* spp. in Minas Padrão cheese in the tested conditions.

Keywords: Dairy foods, EMA, pathogenic microorganisms, qPCR, viability

Introdução

Organização



Instituto
Gaúcho
do Leite



GOVERNO DO ESTADO
RIO GRANDE DO SUL
SECRETARIA DA AGRICULTURA,
PECUÁRIA E AGRONEGÓCIO

Realização



Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento





O leite e seus derivados constituem-se em alimentos altamente nutritivos e são, portanto, meios propícios ao desenvolvimento de micro-organismos, inclusive patogênicos. A ocorrência de surtos de origem alimentar é uma das grandes preocupações mundiais em relação à saúde pública. Dessa forma, o diagnóstico rápido de patógenos é imprescindível para a tomada de decisões (BARBAU-PIEDNOIR et al. 2014). Devido a essa importância, muitos estudos têm sido realizados objetivando o desenvolvimento de técnicas mais rápidas para a identificação de patógenos em alimentos.

As técnicas “padrão ouro” para detecção desses patógenos em alimentos são descritas no *Bacteriological Analytical Methods* (BAM; <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam> apud ELIZAQUÍVEL et al., 2013) e se baseiam em metodologias clássicas. Apesar de essas técnicas serem muito eficientes, são muito demoradas, laboriosas, necessitam de pessoal altamente treinado e têm pouca possibilidade de automação. Técnicas moleculares (como a PCR em Tempo Real ou qPCR), por sua vez, são mais rápidas, sensíveis e específicas. Todavia, podem resultar em uma superestimação de micro-organismos nos alimentos, uma vez que não são capazes de diferenciar entre o DNA de células viáveis e inviáveis.

Para suplantarmos essa desvantagem, Nocker e Camper (2006) utilizaram Brometo de Etídio Monoazida (EMA) combinado à qPCR para detecção de células viáveis de *Salmonella* spp. em culturas puras. O EMA é uma molécula capaz de penetrar em células com membrana danificada (consideradas inviáveis) e se ligar covalentemente ao DNA das mesmas após fotoativação, impedindo, assim, a amplificação do DNA das mesmas durante a qPCR.

Por se tratar de uma metodologia ainda não testada em amostras de queijo Minas Padrão para identificação de patógenos, o objetivo desse trabalho foi estabelecer um protocolo para detecção de células viáveis de *Salmonella* spp. inoculadas em amostras de queijo Minas Padrão utilizando o corante EMA combinado à qPCR.

Material e Métodos

A cepa padrão *Salmonella enterica* sorovar Thyphimurium IAL 1472 foi cultivada em caldo Infusão Cérebro e Coração (BHI) a 37°C durante 12 horas sob agitação de 220 rpm. A suspensão obtida foi dividida em alíquotas de 500 µL, sendo metade das mesmas submetidas ao tratamento térmico em água fervente por 15 minutos para inviabilização das células.

Foram adicionados 224 mL de PBS 1X a 25 g de queijo Minas Padrão previamente analisadas microbiologicamente e negativas para *Salmonella* spp. As amostras foram homogeneizadas manualmente e, em seguida, adicionou-se 1 mL de cultura de células viáveis e inviáveis contendo 10⁹ UFC/mL.

Foram adicionados 50 µg/mL de EMA às amostras viáveis e também às inviáveis. Posteriormente, as mesmas foram incubadas no escuro a 4°C por 5 minutos e expostas à luz halógena 650 W por 5 minutos em cuba com gelo e a uma distância de 20 cm da fonte de luz.

O reagente *PrepMan™ Ultra Sample Preparation Reagent* (Applied Biosystems®, EUA) foi usado para extração de DNA das amostras de queijo inoculado, conforme recomendações do fabricante.

As reações de qPCR foram feitas em duplicata utilizando *TaqMan® Universal PCR Master Mix* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). A sonda e os *primers* foram desenhados para o gene alvo *finC* (PIKNOVÁ et al., 2005).

Os dados foram obtidos em valores de *Cycle Threshold* (Ct) e, a partir dos mesmos, calculou-se o Sinal de Redução do EMA ou EMASR:

$$\text{EMASR} = \frac{(1+E)^{C_{\text{não trat}}}}{(1+E)^{C_{\text{trat}}}}$$

em que “E” é a eficiência da reação, “C_{não trat}” é o valor de Ct das amostras não tratadas com EMA e “C_{trat}” é o valor de Ct das amostras tratadas com de EMA (RUDI et al., 2005).

Resultados e Discussão

O protocolo para detecção de células viáveis de *Salmonella* spp. em queijo Minas Padrão pela técnica de PCR em Tempo Real foi desenvolvido com sucesso. Os valores médios de C_i obtidos na qPCR apresentaram diferença de 8 ciclos de amplificação entre as células inviáveis tratadas e não tratadas com EMA pelo teste t (p<0,05). Em contrapartida, não foi observada diferença estatística entre as amostras

Organização



Instituto
Gaúcho
do Leite



GOVERNO DO ESTADO
RIO GRANDE DO SUL
SECRETARIA DA AGRICULTURA,
PECUÁRIA E AGRONEGÓCIO

Realização



Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento





viáveis tratadas e não tratadas com o intercalante ($p < 0,05$) (Figura 1). Ainda, o valor de C_t das amostras inviáveis tratadas com EMA foi diferente estatisticamente dos valores de C_t das demais amostras, que não diferiram entre si ($p < 0,05$).

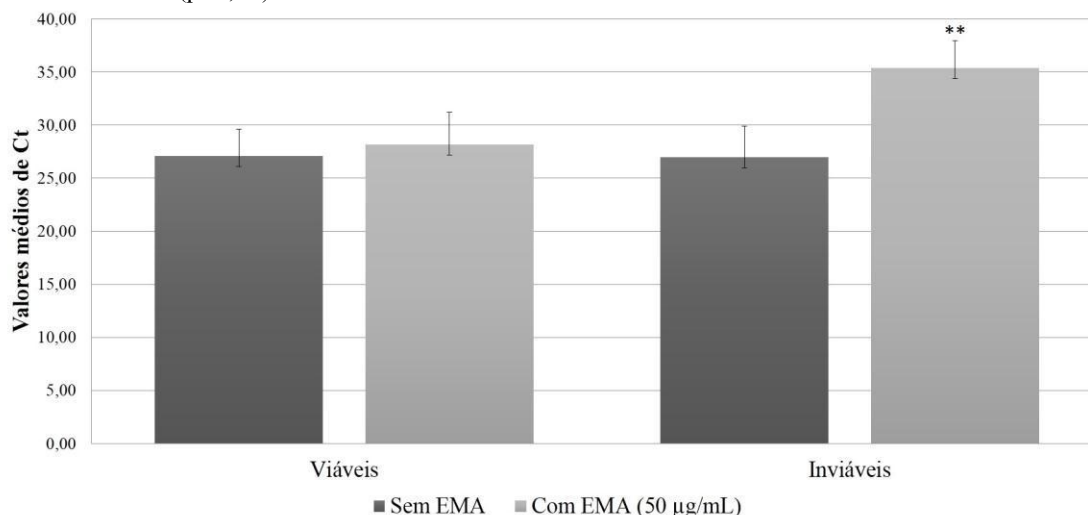


Figura 1 - Valores médios de C_t obtidos na qPCR de amostras de queijo Minas Padrão inoculadas com células viáveis e inviáveis de *Salmonella* spp., tratadas ou não com EMA (50 µg/mL). As barras representam os desvios padrão. ** $p < 0,05$.

Fittipaldi et al. (2012) ressaltaram que a eficiência do protocolo EMA-qPCR na detecção de células viáveis depende das características da matriz da amostra. Fatores como concentração de sal, pH e turbidez podem interferir tanto na ligação do EMA ao DNA das células inviáveis, como também na qPCR propriamente dita. Dessa forma, a realização de testes em diversas matrizes alimentares se torna fundamental para se estabelecer os procedimentos ideais de tratamento das amostras a fim de mitigar essas interferências.

No presente estudo, as amostras de queijo Minas Padrão inoculadas tinham concentração final de 10^6 UFC/g de *Salmonella* spp. Omiccioli et al (2009) destacaram a importância do número de células na reação, uma vez que um alto número das mesmas pode aumentar a turbidez da reação, afetando a interação do EMA com o DNA das células inviáveis gerando resultados falso-positivos.

Os valores de EMASR calculado para as amostras viáveis (0,71) foi 12 vezes maior do que o calculado para as amostras inviáveis (0,06), indicando a eficiência do protocolo em detectar células viáveis de *Salmonella* spp. em queijo Minas Padrão. O EMASR representa a fração do DNA que pode ser amplificada por qPCR nas amostras tratadas com EMA (RUDI et al., 2005), variando de 0 a 1. Portanto, o ideal é que o valor de EMASR calculado para as amostras inviáveis seja o menor possível, indicando que o intercalante foi capaz de impedir a amplificação das mesmas. Seguindo o mesmo raciocínio, é desejável que o EMASR calculado para as amostras viáveis seja o maior possível, demonstrando que mesmo após o tratamento com EMA, as amostras viáveis foram capazes de amplificar por qPCR.

Conclusões

O uso de 50 µg/mL de EMA combinado à técnica de PCR em Tempo Real é capaz de detectar somente células viáveis de *Salmonella* spp. em queijo Minas Padrão nas condições testadas. O protocolo desenvolvido pode ser uma alternativa eficaz em relação aos métodos de cultura tradicionais devido à sua alta especificidade, sensibilidade e rapidez.

Agradecimentos

Apoio Financeiro: CNPq, Embrapa/Monsanto e FAPEMIG.

Organização



Instituto
Gaúcho
do Leite



GOVERNO DO ESTADO
RIO GRANDE DO SUL
SECRETARIA DA AGRICULTURA,
PECUÁRIA E AGRONEGÓCIO

Realização



Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento





Literatura citada

BARBAU-PIEDNOIR, E.; MAHILLON, J.; PILLYSER, J.; COUCKE, W.; ROOSENS, N. H.; BOTTLELDOORN, N. Evaluation of viability-qPCR detection system on viable and dead *Salmonella* serovar Enteritidis. **Journal of Microbiological Methods**, v. 113, p. 131-137, 2014.

ELIZAQUÍVEL, P.; AZNAR, R.; SÁNCHEZ, G. Recent developments in the use of viability dyes and quantitative PCR in the food microbiology field. **Journal of Applied Microbiology**, v. 116, p. 1-13, 2013.

FITTIPALDI, M.; NOCKER, A.; CODONY, F. Progress in understanding preferential detection of live cells using viability dyes in combination with DNA amplification. **Journal of Microbiological Methods**, v. 91, p. 276-289, 2012.

NOCKER, A.; CAMPER, A. K. Selective removal of DNA from dead cells of mixed bacterial communities by use of ethidium monoazide. **Applied and Environmental Microbiology**, n. 3, v. 72, 2006.

OMICCIOLI, E.; AMAGLIANI, G.; BRANDI, G.; MAGNANI, M. A new platform for Real-Time PCR detection of *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157 in milk. **Food Microbiology**, v. 26, p. 615-622, 2009.

PIKNOVÁ, L.; KAKLÍKOVÁ, E.; PANGALLO, D.; POLEK, B.; KUČHTA, T. Quantification of *Salmonella* by 5'-nuclease qPCR targeted to *finC* gene. **Current Microbiology**, v. 50, p. 38-42, 2005.

RUDI, K.; MOEN, B.; DROMTORP, S. M.; HOLCK, A. L. Use of ethidium monoazide and PCR in combination for quantification of viable and dead cells in complex samples. **Applied and Environmental Microbiology**, n. 2, v. 71, p. 1018-1024, 2005.

Organização



Instituto
Gaúcho
do Leite



GOVERNO DO ESTADO
RIO GRANDE DO SUL
SECRETARIA DA AGRICULTURA,
PECUÁRIA E AGRONEGÓCIO

Realização



Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento

