

XVI Workshop de Iniciação Científica da Embrapa Gado de Leite
Juiz de Fora – 13 de Agosto de 2015

Deteção de células viáveis de *Salmonella* spp. em queijo Coalho pela técnica de PCR em Tempo Real

Felipe de Oliveira Vieira¹, Juliana França Monteiro de Mendonça², Isabela Fonseca³, Edna Froeder Arcuri⁴, João Batista Ribeiro⁴, Marta Fonseca Martins⁴

¹Graduando em Ciências Biológicas. – CESJF, Juiz de Fora, MG. bolsista PIBIC-CNPq. e-mail: felipe_vieira89@yahoo.com.br

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

³Bolsista Pós-doutorado CNPq. Embrapa Gado de Leite. Juiz de Fora, MG.

⁴Pesquisador. - Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. e-mail: edna.arcuri@embrapa.br, joao-batista.ribeiro@embrapa.br, marta.martins@embrapa.br

Resumo: O queijo Coalho é um derivado do leite muitas vezes produzido sem padrões higiênico-sanitários, favorecendo a disseminação de micro-organismos patogênicos. Para a deteção de micro-organismos nos alimentos a metodologia microbiológica clássica é a mais utilizada, porém é laboriosa e demorada. O desenvolvimento de métodos moleculares para a identificação de bactérias representa uma alternativa rápida, sensível e específica para a deteção. Um fator limitante desta metodologia é a incapacidade da distinção do DNA de células vivas e mortas. Para superar esta limitação, o intercalante de DNA Brometo de Etídio Monoazida (EMA) pode ser utilizado, pois permite a diferenciação do DNA de células viáveis de inviáveis. O EMA se liga ao DNA de células inviáveis com a membrana celular danificada, impedindo a amplificação deste. O objetivo desse trabalho foi estabelecer um protocolo utilizando EMA combinado à qPCR para deteção de células viáveis de *Salmonella* spp. em amostras de queijo Coalho. Foram crescidas culturas de células de *Salmonella*, das quais metade foi submetida a um tratamento térmico para inativação das células. Amostras de 10 g de queijo coalho foram inoculadas com 1 mL de cultura contendo 10⁹ UFC/mL de *Salmonella* spp. viáveis e inviáveis e 89 mL de PBS foram adicionados à mistura, esta foi separada em microtubos contendo 1 mL na concentração final de 10⁶ UFC/mL. A estas amostras foi



Gado de Leite

XIV Workshop de Iniciação Científica da Embrapa Gado de Leite
Juiz de Fora – 28 de Julho de 2014

adicionado corante EMA na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$, posteriormente foram incubadas no escuro por 5 minutos a 4 °C e, em seguida, expostas à luz halógena por 5 minutos em cuba com gelo a 20 centímetros de distância da fonte de luz. Após este tratamento foi realizada a extração do DNA e a qPCR. A diferença de Ct (*cycle threshold*) entre as amostras inviáveis tratadas com EMA e as demais foi de aproximadamente 8 ciclos de amplificação. Isto indica que a metodologia utilizando EMA-qPCR foi capaz de diferenciar o DNA das células viáveis e inviáveis presentes no queijo coalho.

Palavras-chave: EMA-PCR, metodologias moleculares, segurança do alimento