

Área: **Microbiologia de Alimentos (Divisão K)**

USO DE BROMETO DE ETÍDEO MONOAZIDA E PCR EM TEMPO REAL PARA DETECÇÃO DE CÉLULAS VIÁVEIS DE *LISTERIA MONOCYTOGENES*

Rosinéa Aparecida de Paula (*AgroGenética*); **Renata Flávia Ferreira E Freitas** (*AgroGenética*); **Marta Fonseca Martins Guimarães** (*Embrapa*); **Francismar Corrêa Marcelino** (*Embrapa*); **Edna Froeder Arcuri** (*Embrapa*)

Resumo

A análise de PCR em Tempo Real está sendo cada vez mais utilizada para detecção e quantificação de patógenos em amostras de alimentos, uma vez que gera resultados mais rápidos e específicos. A restrição para um uso mais amplo desta técnica é que devido a sua alta sensibilidade, os teste identificam o DNA de células mortas, tornando-o inadequado para fins de diagnóstico. Para contornar este problema tem sido proposto o uso do corante Brometo de Etídeo Monoazida (EMA) para discriminar células viáveis de células mortas. Em estudos preliminares foi verificado que EMA inibe amplificação de células inviáveis de *Listeria monocytogenes*, por PCR convencional. O objetivo deste estudo foi padronizar a técnica EMA-PCR em Tempo Real para detecção de células viáveis de *L. monocytogenes*. Foram construídos *primers* e sonda TaqMan específicos para *L. monocytogenes* e o gene *prfA* foi utilizado como sequência alvo. Foram avaliadas várias espécies de *Listeria*, sendo que houve amplificação apenas de *L. monocytogenes* indicando especificidade da amplificação e *L. monocytogenes* ATCC 7644 foi selecionada para os testes de EMA-PCR. Concentrações variadas de EMA foram adicionadas a microtubos com 10^8 células viáveis ou inviáveis de *L. monocytogenes* (tratamento térmico de 98 °C/20 minutos) e estes foram expostos à luz (650 W) por 15 minutos para ativação e fotólise do EMA. Em seguida, foi realizada a extração de DNA e PCR em Tempo Real. O DNA foi extraído após tratamentos subseqüentes das células com proteases e fervura. A reação de amplificação foi preparada com TaqMan Universal Master Mix 1X (Applied Biosystem), 250 ng de DNA, 400 nM de cada *primer* e 400 nM de sonda. A concentração de 6 ug/mL de EMA foi necessária para inibir a amplificação de DNA de células inviáveis de *L. monocytogenes* sendo que nesta concentração não houve interferência na amplificação de DNA de células viáveis. Após a definição desta concentração, o tratamento das células com 6 ug/mL de EMA foi realizado novamente, porém os microtubos foram expostos à luz por diferentes períodos de tempo para otimização do tempo de exposição à luz. O tempo de 5 minutos foi necessário para a completa fotólise de EMA. A técnica EMA-PCR em Tempo Real apresenta-se como uma ferramenta eficiente na detecção de apenas células viáveis de *L. monocytogenes* presentes numa amostra.

Palavras-chaves: EMA, PCR em Tempo Real, *Listeria monocytogenes*

Apoio Financeiro: FAPEMIG

Palavras-chave: EMA, *Listeria monocytogenes*, PCR em Tempo Real