

DETECÇÃO DE CÉLULAS VIÁVEIS DE *Salmonella* spp. POR PCR EM TEMPO REAL

*De PAULA, R. A.¹, GUIMARÃES, M. F. M.², MARCELINO, F. C.³, ARCURI, E. F.²

¹AgroGenética, ²Embrapa Gado de Leite, ³Embrapa Soja

*Autor para correspondência: rosineia@agrogenerica.com.br

1. Introdução

Salmonella provocam uma das mais comuns infecções entéricas no mundo. No Brasil, período de 1999 a 2008, a Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde constatou a prevalência de *Salmonella* sp. em 42,9% dos surtos de doenças atribuídas ao consumo de alimentos.

O método tradicional para isolamento e identificação de *Salmonella* em alimentos, é demorado e para acelerar o processo técnicas de biologia molecular têm sido aplicadas. A detecção de patógenos via PCR pode levar a resultados falso-positivos, pois é possível a detecção do DNA mesmo que o patógeno não se encontre viável (Hein et al., 2006). Uma estratégia utilizada recentemente para discriminar células viáveis de inviáveis por PCR é o uso de Brometo de Etídeo Monoazida (EMA). EMA é um corante capaz de se ligar covalentemente ao DNA de células mortas impedindo a sua amplificação pela DNA polimerase (Rudi et al., 2005).

2. Objetivo

Determinar a concentração de EMA necessária para inibir a amplificação de DNA de células inviáveis de *Salmonella* spp. sem inibir a amplificação de DNA de células viáveis.

3. Material e Métodos

3.1. Bactérias e Condições de Cultivo

Os sorotipos de *Salmonella* utilizados foram: *S. Typhimurium* IAL 1472 e ATCC 14028, *S. Typhi* IAL 1251, *S. Enteritidis* ATCC 13076, pT4 578 e pT4 963, e *S. Choleraesuis* ATCC 15076. As culturas foram crescidas em caldo BHI e incubadas a 35 °C/18-20 horas.

3.2. Tratamento das culturas com EMA

Concentrações variadas da solução estoque de EMA (Sigma®) foram adicionadas a uma série de microtubos contendo 500 µL de 10⁸ células viáveis ou inviáveis (tratamento

térmico de 98 °C por 20 minutos). Os microtubos foram expostos à luz (650 W), para ativação e fotólise do EMA e em seguida foi realizada a extração de DNA e PCR. O experimento foi realizado com duas repetições.

3.3. Extração de DNA e PCR Convencional e Tempo Real

O DNA das células foi extraído pelo método da fervura, em banho-maria, em 100 µL de TE (pH 8,0) e quantificado em espectrofotômetro (NanoDrop, Thermo Fisher Scientific).

Os primers ST11 e ST15 utilizados na PCR convencional amplificam um fragmento de 429 pb e são específicos para o gênero *Salmonella* (Aabo et al. 1973). Os primers e sondas TaqMan® utilizados na PCR em Tempo Real, específicos para *Salmonella* sp, foram construídos de acordo com Hein et al. (2006), onde um fragmento de 285 pb do gene *invA* foi utilizado como sequência alvo. Um volume de 50 µL de reação contendo 2µl de DNA foi utilizado na PCR convencional (GeneAmp® PCR System 9700). A PCR em Tempo Real foi realizada em termociclador ABI PRISM® 7000 (Applied Biosystem) e a reação de amplificação (25µL) foi preparada com TaqMan Universal Master Mix 1X (Applied Biosystem), 250 ng de DNA, 400 nM de cada primer e 400 nM de sonda.

4. Resultados e Discussão

Neste estudo realizado com sete sorotipos de *Salmonella*, os primers e sondas construídos amplificaram o gene alvo (*invA*) nas reações de PCR em Tempo Real. O valor médio de C_T foi de $20,78 \pm 0,48$, indicando eficiência de amplificação para todas as linhagens testadas. *S. Typhimurium* IAL 1472 foi selecionada para os testes de EMA-PCR.

Os resultados da PCR convencional mostram que não ocorreu amplificação do DNA alvo quando células viáveis foram tratadas com concentração de EMA até 5 µg/mL (Figura 1a). A amplificação do DNA alvo de células inviáveis foi completamente inibida quando foi utilizado EMA a uma concentração de 5 µg/mL ou superior (Figura 1b e c).

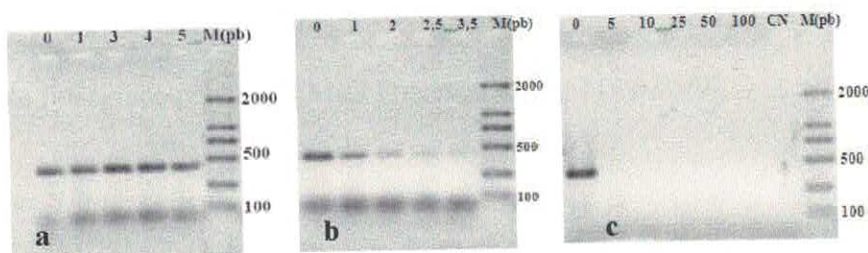


Figura 1. Análise eletroforética da amplificação do fragmento de *S. Typhimurium* IAL 1472. CN- Controle negativo. Números nas canaletas indicam as concentrações de EMA (µg/mL) em que as células foram submetidas. (a) Células viáveis, (b) e (c) Células inviáveis.

Certificado

Certificamos que o trabalho

Detecção de Células viáveis de Salmonella spp. por PCR em tempo real.
de autoria de De Paula, R. A. , Guimarães, M. F. M. , Marcelino, F. C., Arcuri, E. F.
XVI Encontro Nacional e II Congresso Latino-americano
de Analistas de Alimentos

Belo Horizonte, 23 de Julho de 2009


Deise Aparecida Pinati Marsiglea
Presidente da SBAAL

PROMOÇÃO



 **FUNED**
Fundação
Ezequiel Dias

REALIZAÇÃO



Rita Maria Lopes Portocarrero Naveira
Presidente do ENAAL

