

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

Detection of viable cells of *Salmonella* spp. by real-time PCR technique

Juliana França Monteiro de MENDONÇA⁽¹⁾
Felipe de Oliveira VIEIRA⁽²⁾
Isabela FONSECA⁽³⁾
Edna Froeder ARCURI⁽⁴⁾
João Batista RIBEIRO⁽⁴⁾
Marta Fonseca MARTINS⁽⁴⁾

1. Introdução

Dentre as várias metodologias descritas para identificação de micro-organismos em alimentos, a técnica de PCR em Tempo Real (qPCR) assume um importante papel devido à sua alta especificidade, sensibilidade e rapidez em relação aos métodos tradicionais. Entretanto, essa técnica é incapaz de diferenciar entre o DNA de bactérias viáveis e inviáveis, gerando assim resultados falso-positivos (ELIZAKUÍVEL et al., 2013). O uso de intercalantes de DNA, como o Brometo de Etídio Monoazida (EMA), combinados à qPCR torna possível a detecção específica de patógenos viáveis presentes nos alimentos. O EMA é capaz de penetrar nas células com membrana danificada (consideradas inviáveis) e, após fotoativação, ligar-se covalentemente ao DNA das mesmas, impedindo sua amplificação (NOCKER e CAMPER, 2006). O objetivo deste trabalho foi estabelecer um protocolo baseado em qPCR para detecção de células viáveis de *Salmonella* spp. em culturas puras utilizando EMA.

2. Material e Métodos

A estirpe padrão *Salmonella enterica* sorovar Thyphimurium IAL 1472 foi utilizada para o cultivo em caldo Infusão de Cérebro e Coração (BHI) a 37°C durante 12 horas sob agitação rotacional de 220 rpm. A suspensão obtida foi dividida em alíquotas de 500 µL. Metade das alíquotas foi submetida ao tratamento térmico em água fervente por 15 minutos para inviabilização das células.

Adicionou-se EMA a uma concentração de 50 µg/mL às amostras viáveis e também às inviáveis. Em seguida, as mesmas foram incubadas no escuro a 4°C por

¹Estudante de Mestrado. Universidade Federal de Juiz de Fora. Juiz de Fora, MG. E-mail: julianafmm@yahoo.com.br

²Estudante de Iniciação Científica. Centro de Ensino Superior de Juiz de Fora. Juiz de Fora, MG.

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

⁴Docentes. Embrapa Gado de Leite. Juiz de Fora, MG.

5 minutos. Posteriormente, foram expostas à luz halógena de 650 W por 5 minutos em cuba com gelo e a uma distância de 20 cm da fonte de luz.

A extração de DNA foi realizada com o *DNeasy® Blood&Tissue Kit* (Qiagen, Hilden, Alemanha), utilizando o protocolo para bactérias Gram-negativas conforme recomendações do fabricante.

As reações de qPCR foram feitas com *TaqMan® Universal PCR Master Mix* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Os primers e a sonda utilizados foram desenhados para o gene *finC* e as sequências foram obtidas a partir do descrito em Píknová et al., 2005.

Os testes foram feitos com amostras em duplicata, sendo os dados obtidos em valores de *Cycle Threshold* (C_t). A partir dos valores de C_t calculou-se o Sinal de Redução do EMA ou EMASR:

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

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

3. Resultados e Discussão

A qPCR apresentou valores médios de C_t com diferença de 11 ciclos de amplificação entre as amostras inviáveis tratadas ou não com EMA, o que foi considerado estatisticamente significativo pelo Teste t ($p < 0,05$). Também não houve diferença entre a amostra inviável sem o tratamento com o intercalante e as amostras viáveis com e sem adição de EMA (Figura 1).

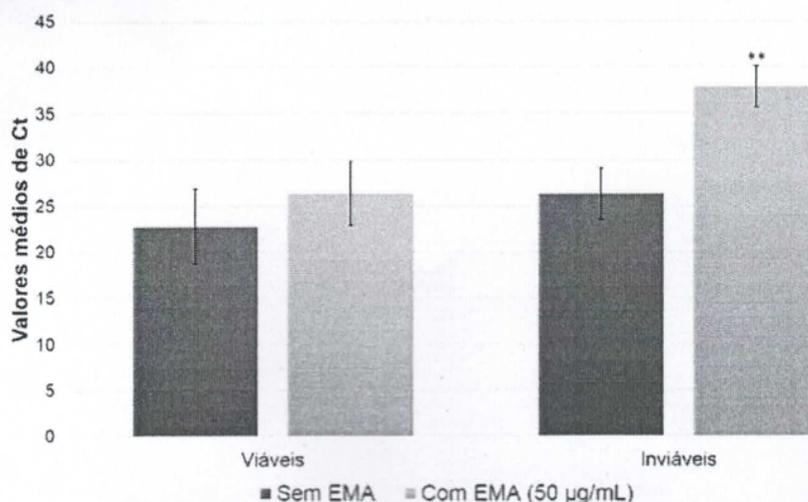


Figura 1 –Valores médios de C_t obtidos na qPCR de células viáveis e inviáveis de *Salmonella* spp., tratadas ou não com EMA (50 µg/mL). As barras representam os desvios padrão. ** $p < 0,05$.

Não foi observada diferença estatística entre os valores de C_t das amostras viáveis, indicando que o intercalante não teve efeito sobre as mesmas. Fittipaldi et al. (2012) afirmaram que o EMA pode se ligar ao DNA de células viáveis quando for usado em altas concentrações nas reações (acima de 100 µg/mL), gerando, assim, valores de C_t mais altos na qPCR.

Wang e Mustapha (2009) afirmaram que a concentração mínima de EMA necessária para inibir a amplificação do DNA de células inviáveis é 10 µg/mL. Em contrapartida, os mesmos autores observaram que quanto maior a concentração de EMA utilizada, maior foi a inibição da amplificação de células viáveis. Além disso, o uso do intercalante acima de 100 µg/mL seguido de fotoativação pode ter efeito bactericida (SOEJIMA et al., 2007).

Os valores de EMASR calculados para as amostras viáveis e inviáveis foram 0,3 e 0,02, respectivamente. Este resultado mostra que com a utilização do EMA, o EMASR diminuiu 15 vezes, o que indica a alta eficiência do protocolo estabelecido em detectar células viáveis de *Salmonella* spp. por qPCR combinada ao uso do intercalante. 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. O valor de EMASR calculado para amostras inviáveis deve ser o menor possível, indicando que uma pequena ou nenhuma fração do DNA dessas células pode ser amplificada após o tratamento com o intercalante. Já para as amostras viáveis, o

ideal é que o valor de EMASR seja o maior possível, confirmando a incapacidade do EMA em ligar-se ao DNA dessas células e impedir sua amplificação.

4. Conclusões

O uso de 50 µg/mL de EMA é capaz de impedir a amplificação do DNA de células inviáveis de *Salmonella* spp. em culturas puras e, nessa mesma concentração não impede a amplificação do DNA das células viáveis. Dessa forma, o protocolo desenvolvido constitui-se em uma importante ferramenta na diferenciação de células viáveis e inviáveis de *Salmonella* spp. em culturas puras.

Abstract

This work aimed to detect viable cells of *Salmonella* spp. from pure culture by real-time PCR. A difference of 11 cycles was observed between dead samples without and with EMA (50 µg/mL). The EMASR calculated for viable samples was 0,3, while for dead samples was 0,02 (decreased 15 times), indicating that the protocol using EMA-qPCR was efficient to differentiate viable and dead cells in the tested conditions.

Agradecimento

Apoio Financeiro: CNPq e Embrapa/Monsanto.

Referências Bibliográficas

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.

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.

SOEJIMA, T.; IIDA, K.; QIN, T.; TANIAI, H.; SEKI, M.; TAKADE, A.; YOSHIDA, S. Photoactivated ethidium monoazide directly cleaves bacterial DNA and is applied to PCR for discrimination of live and dead bacteria. **Microbiology and Immunology**, n. 8, v. 51, p. 763-775, 2007.

WANG, L.; LI, Y.; MUSTAPHA, A. Detection of viable *Escherichia coli* O157:H7 by ethidium monoazide real-time PCR. **Journal of Applied Microbiology**, v. 107, p. 1719-1728, 2009.