

Detecção e Quantificação de Células Viáveis de *Salmonella* spp. Através de PCR em Tempo Real

Fernanda Camargo Antunes, Carlos Alexandre Sanchez Ferreira, Sílvia Dias de Oliveira
(orientador)

Laboratório de Imunologia e Microbiologia, PUCRS, Porto Alegre, RS, Brasil.

Introdução

A *Salmonella* é um patógeno capaz de infectar uma grande variedade de animais, podendo sobreviver em água, solo e alimentos por um extenso período de tempo (Crum-Cianflone *et al.*, 2008). A salmonelose em humanos ocorre principalmente pela ingestão de alimentos contaminados, especialmente ovos crus e/ou carne de aves (Tavechio *et al.*, 1996). A determinação da presença deste patógeno em alimentos é realizada através de métodos clássicos de cultivo e identificação, que, embora, apresentem alta sensibilidade, são trabalhosos e demandam um tempo prolongado para a sua execução. Desta forma, estas limitações poderiam ser contornadas pela utilização de métodos moleculares, como a PCR. No entanto, a aplicação desta técnica para a detecção e quantificação de patógenos, apresenta a limitação de não diferenciar entre células vivas e mortas (Wolffs *et al.*, 2004), sendo um problema particular de alimentos processados ou estocados por períodos prolongados (Rudi *et al.*, 2005). Porém, existem estudos que apresentam o propídio monoazida (PMA) como uma alternativa para a marcação de células não viáveis. O PMA é um agente intercalante do DNA que atravessa apenas a membrana de células mortas, impedindo a amplificação do DNA pertencente a estas células, bem como do DNA livre.

Portanto, este projeto tem por objetivo padronizar um método molecular eficaz e rápido na detecção e quantificação de células viáveis de *Salmonella* spp., através de PCR convencional e, posteriormente, de PCR em tempo real utilizando o tratamento com PMA como marcador de viabilidade.

Metodologia

Para a realização deste projeto, foi utilizada a ATCC 14028 de *Salmonella* Typhimurium. Inicialmente, foi determinado o limite de detecção da PCR convencional utilizando o gene *invA* de *Salmonella* como alvo. Para tanto, foram realizadas diluições até 10^{-9} de uma cultura bacteriana oriunda da incubação em caldo BHI (Brain Heart Infusion) por 18 h a 37°C. Em seguida, as diluições 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} e 10^{-9} foram semeadas em superfície de agar padrão para contagem em duplicata. Paralelamente, foi realizada a extração de DNA a partir das culturas diluídas pelo protocolo que utiliza tiocianato de guanidina (Rademaker & Bruijn, 1997). O DNA extraído foi utilizado como molde na PCR utilizando as seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C durante 5 minutos, 35 ciclos de desnaturação de 94°C durante 30 segundos; anelamento com temperatura de 56° durante 30 segundos, alongamento a 72°C durante 30 segundos, com uma extensão final de 72°C durante 7 minutos.

O tratamento com PMA foi realizado com as concentrações 20, 18, 16, 14, 12, 10, 5, 1 µg/mL, adicionando-se diferentes volumes de PMA a 500 µL de cultura bacteriana contendo aproximadamente $6,2 \times 10^8$ UFC/mL, para averiguar qual a concentração mínima de PMA necessária para inibir completamente a amplificação do DNA de células mortas na PCR. O tratamento com isopropanol a 70% por 30 min e a incubação a 100°C por 20 min foram avaliados para a utilização na inviabilização das células bacterianas.

Depois da adição do PMA, homogeneizaram-se os tubos, mantendo-os no escuro, por 10 minutos. Em seguida, os tubos foram colocados em uma caixa com gelo e expostos à luz halógena, para a ligação do PMA ao DNA por 10 minutos. Logo após, foi realizada a extração do DNA pelo mesmo método referido acima.

Resultados e Discussão

A amplificação específica de fragmentos de DNA de 284 pb foi obtida a partir do DNA extraído por tiocianato de guanidina oriundo de uma cultura pura de *S. Typhimurium*, obtendo-se um limite de detecção de 1 UFC/mL. Este valor será utilizado como referência para a avaliação da sensibilidade do protocolo utilizando o PMA como marcador de viabilidade.

O tratamento com 1 mL de isopropanol a 70% por 30 minutos foi escolhido como método para matar as células bacterianas, pois proporcionou mais clareza na observação da ação do PMA. Através dos experimentos realizados com PMA foi possível observar que

quanto menor a concentração de PMA, menor foi a intensidade da banda visualizada a partir da eletroforese em gel de agarose dos produtos de amplificação utilizando o DNA extraído de células não viáveis tratadas com PMA como molde. Desta forma, pode-se sugerir que concentrações mais elevadas de PMA possam implicar em uma possível inibição da PCR. Isso mostra que, apesar de ainda não ter sido determinada a concentração necessária para inibir completamente a amplificação do DNA, o PMA está sendo eficaz na medida em que tem a capacidade de penetrar nas células mortas com a membrana comprometida e intercalar no DNA após exposição à luz.

Conclusão

Embora a concentração ideal do PMA para a marcação de inviabilidade de *Salmonella* spp. ainda não esteja determinada, foi observada uma tendência de que com menores concentrações de PMA ocorra uma maior inibição da amplificação de DNA oriundo de células mortas.

Apoio financeiro: PROBIC/FAPERGS

Referências

- CRUM-CIANFLONE N.F. Salmonellosis and the GI tract: more than just peanut butter. **Curr Gastroenterol Rep** 2008; 10: 424–431.
- RUDI K., NATERSTAD, K., DRØMTORP, S.M., HOLO, H. Detection of viable and dead *Listeria monocytogenes* on gouda-like cheeses by real-time PCR. **Lett. Appl. Microbiol.**, 2005; 40:301–306.
- TAVECHIO A.T., FERNANDES A.S., NEVES B.C., DIAS A.M.G. and IRINO K. Changing patterns of *Salmonella* serovars: increase of *Salmonella* Enteritidis in São Paulo, Brazil. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo** 1996; 38:315-322.
- WOLFFS, P., KNUTSSON, R., NORLING, B., RÅDSTRÖM, P. Rapid quantification of *Yersinia enterocolitica* in pork samples by a novel sample preparation method, flotation, prior to real-time PCR. **J. Clin. Microbiol.**, 2004; 42:1042–1047.
- RADEMAKER, J.L.W., BRUIJN, F.J. **Characterization and classification of microbes by REP-PCR genomic fingerprinting and computer-assisted pattern analysis. In DNA markers: protocols, applications, and overviews.** New York: Caetano-Anollés, G, Gresshoff, P. M. 1997.