



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

Fernanda Camargo Antunes, Sílvia Dias de Oliveira (orientador)

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

### **Resumo**

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. Tradicionalmente, a determinação da presença deste patógeno é realizada através de métodos clássicos de cultivo, que são sensíveis, porém trabalhosos e demorados. Tais limitações podem ser contornadas utilizando métodos moleculares, como a PCR. No entanto, a aplicação desta técnica para a detecção e quantificação de patógenos tem como limitação não diferenciar células vivas e mortas. O propídio monoazida (PMA) pode ser utilizado como marcador de viabilidade, já que é um agente intercalante do DNA que atravessa a membrana das células mortas, quando exposto à luz halógena, impedindo a amplificação do DNA das mesmas. 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. As técnicas foram padronizadas utilizando a cultura de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028. A amplificação específica de fragmentos de DNA de 284 pb foi obtida a partir do DNA extraído por tiocianato de guanidina. Primeiramente, o limite de detecção da PCR convencional foi determinado em 1 UFC/mL, valor utilizado como referência para a avaliação da sensibilidade do protocolo utilizando o PMA como marcador de viabilidade. Posteriormente, 500 µL de cultura bacteriana morta com 1 mL de isopropanol por 30 minutos, método escolhido para inviabilizar as células pois proporcionou mais clareza na observação da ação do PMA, foram misturadas com diferentes volumes de PMA obtendo-se as concentrações: 20, 18, 16, 14, 12, 10, 5 e 1 µg/mL. 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. 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 e CNPq.