

## UTILIZAÇÃO DE COLÔNIA E DNA EXTRAÍDO NA DETECÇÃO DE *Salmonella* spp. POR qPCR E PCR CONVENCIONAL

Germana Vizzotto Osowski<sup>1</sup>, Lana Teixeira Fernandes<sup>2</sup>, Sandra Camile Almeida Mota<sup>3</sup>,  
Sabrina Castilho Duarte<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Graduanda em Ciências Biológicas pela Universidade do Oeste de Santa Catarina, Campus Joaçaba, estagiária da Embrapa Suínos e Aves, bolsista CNPQ/PIBIC, germanavizzottoosowski@hotmail.com

<sup>2</sup>Médica Veterinária, responsável técnico Cedisa

<sup>3</sup>Analista da Embrapa Suínos e Aves

<sup>4</sup>Pesquisadora da Embrapa Suínos e Aves

**Palavras-chave:** diagnóstico, detecção molecular, extrações.

### INTRODUÇÃO

A *Salmonella* spp. é uma bactéria veiculada pelo consumo de alimentos de origem animal, e é amplamente distribuída na natureza colonizando uma variedade de animais, incluindo aves comerciais, podendo causar um grande problema avícola e de saúde pública (7). É um dos gêneros bacterianos mais estudados em função da alta patogenicidade que alguns sorovares apresentam. A evolução no diagnóstico desta bactéria tem aumentado a busca pela padronização de técnicas que possam ser utilizadas para uma detecção mais rápida com alta sensibilidade e especificidade. Dentre as ferramentas de diagnóstico destacam-se as técnicas moleculares, tais como a reação em cadeia da polimerase (PCR) e a PCR quantitativa (qPCR), estratégias úteis para detecção do DNA da bactéria em diferentes amostras. A utilidade clínica da PCR expandiu-se com o desenvolvimento da qPCR que permitiu não só a detecção, mas também a quantificação de ácidos nucleicos direcionados em espécimes clínicos (3). Nestas técnicas uma grande interferência deve-se a qualidade da extração a partir das diferentes amostras analisadas. A sensibilidade e a especificidade desses métodos dependem em grande parte da matriz de amostras, da presença de células cultiváveis e de ausência de substâncias inibidoras (8). O uso de uma metodologia que não necessite de extração de DNA purificado, sendo mais rápida e menos onerosa pode auxiliar na melhoria e rapidez do diagnóstico de bacterioses (6). PCR de colônia é uma ferramenta que permite rastreio rápido e fácil através de grande número de colônias e possibilita a distinção entre verdadeiros positivos e falsos positivos (1). Esta técnica é comumente utilizada para rastrear colônias após transformação com plasmídeo recombinante e amplificação de fragmentos de DNA visando posterior sequenciamento ou clonagem (9). O objetivo deste trabalho foi avaliar a viabilidade do PCR de colônia utilizando-se qPCR e PCR convencional para detecção de *Salmonella* na rotina do laboratório.

### MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização dos testes foi utilizada uma cepa de *Salmonella* Heidelberg ATCC 8326 (SH), uma cepa de *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 (SE) e uma cepa de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 (ST). Essas amostras foram enriquecidas em caldo BHI, incubadas a 37°C, por 18 a 24 horas e em seguida foram plaqueadas em ágar Verde Brilhante, XLT4 e TSA. Das placas de TSA utilizou-se 3 mm de colônia compatível com as características de *Salmonella* previamente confirmadas por bioquímica complementar. As colônias foram colhidas com agulhas de plástico descartáveis (alças de 1 µL) e inoculadas diretamente no mix das PCRs. As amostras foram também submetidas a processo de extração de DNA utilizando-se o kit QIAamp Cador (Qiagen®) de acordo com as especificações dos fabricantes. Para a realização da PCR convencional foram utilizadas colônias das placas referentes a SH, SE e ST conforme descrito acima e o DNA extraído por Kit destes três sorovares. Para o *mix* foi estabelecido o volume final de 25 µL, composto por 12,6 µL de água ultra pura, 4µL de Tampão para PCR 10X, 2,0 µL de Cloreto de Magnésio (MgCl<sub>2</sub>) 50 mM, 1,2 µL de dNTP 10 mM, 1,5 µL (10 mM) do iniciador *forward*, 1,5 µ (10 mM) do iniciador *reverse*, 0,20 µL de Taq 5 U/µL (Invitrogen®) e 2 µL do DNA genômico da amostra. As sequências de nucleotídeos dos iniciadores utilizados foram 5'-GTGAAATTATCGCCACGTTCCGGGCAA-3' e 5'-TCATCGCACCGTCAAA GGAACC-3' (5) para os primers senso e anti-senso respectivamente, propiciando a detecção do gene *inv* da *Salmonella* spp. O processo de amplificação foi realizado em termociclador programado para um ciclo inicial de 95°C por três minutos (desnaturação inicial), seguido de 40 ciclos repetidos de 94°C por 30 segundos (desnaturação), 61°C por 30 segundos (anelamento) e 72°C por 30 segundos (extensão). A programação era finalizada com 10 minutos a 72°C (extensão final). Foi incluso controle negativo. Os produtos de DNA amplificados pela PCR convencional foram aplicados em gel de agarose 1,5% incorporado com 10% de solução de brometo de etídio, seguido de visualização em transiluminador de UV. As alíquotas de DNA e as colônias dos três sorovares foram também submetidos a PCR em tempo real. As reações foram preparadas com iniciadores, sonda e reagentes para PCR em tempo real em protocolo padronizado previamente para detecção de *Salmonella* spp. (4). As condições da reação foram 50°C durante cinco minutos, 95°C durante 10 minutos e 45 repetições de 95°C por 15 segundos e 60°C por 45 segundos. As leituras da fluorescência foram realizadas pelo equipamento StepOnePlus (Applied Biosystems™) a cada ciclo de amplificação e, posteriormente, analisadas pelo Software v 2.2.2 (Applied Biosystems™). Todas as amostras foram submetidas às mesmas condições de análise e normalizadas pelo corante ROX. O resultado analisado foi expresso em valor de CT (ciclo que equivale ao limiar de detecção).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A metodologia de PCR de colônia amplificou fragmentos de PCR de 284pb, conforme esperado, de maneira semelhante ao observado na PCR realizada a partir do DNA extraído nos três isolados testados (100%) (Figura 1). O teste de qPCR de colônia teve uma média de CT de 18,16 e a média observada nas amostras de DNA extraído foi de 18,27. Como esperado, o CT dos três isolados de *Salmonella* foram semelhantes (Tabela 1). Kong et al (2) alertam que em protocolos com uso de PCR direto de colônia 1 a 3% das amplificações podem falhar devido a variação no diâmetro dos palitos de dente comumente utilizados para “pescar” a colônia. Buscamos minimizar este efeito adotando uma agulha comumente utilizada em microbiologia, estabelecendo a quantidade necessária e padronizada de DNA.

## CONCLUSÕES

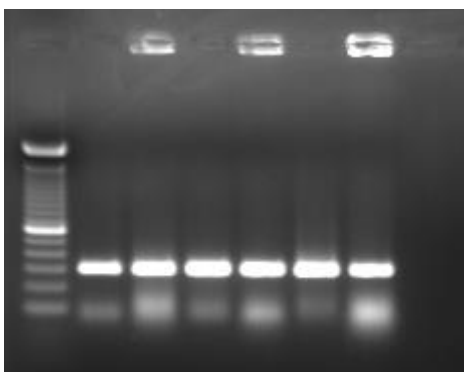
A qPCR e a PCR convencional para detecção de *Salmonella* realizadas com DNA obtido diretamente da colônia apresentaram resultado compatível ao realizado empregando-se DNA extraído com kit tradicional. A metodologia mostrou-se útil e capaz de propiciar a detecção do agente, com redução de custos e aumento da rapidez na detecção.

## REFERÊNCIAS

- Bergkessel, M; Guthrie, C. Colony PCR. **Methods in Enzymology**, Volume 529, 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-418687-3.00025-2>.
- Kong, P., Richardson, P.A., Hong, C. 2005. Direct colony PCR-SSCP for detection of multiple pythiaceous oomycetes in environmental samples. **J. Microbiol. Methods** 61, 25– 32.
- Kuypers, J; Jerome, K.R. Applications of Digital PCR for Clinical Microbiology **Journal of Clinical Microbiology** June 2017 Volume 55 Issue 6. 2017.
- Malorny, B.; Paccassoni, E.; Fach, P.; Bunge, C.; Martin, A. and Helmuth, R. Diagnostic Real-Time PCR for Detection of *Salmonella* in Food. Appl. **Environ. Microbiol.** 2004, 70(12): 7046–7052.
- OLIVEIRA, S.D., SANTOS, L.R., SCHUCH, D.M.T., SILVA, A.B., SALLE, C.T.P., CANAL, C.W. Detection and identification of Salmonella from poultry related samples by PCR. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 87, n. 1, p. 25-35, 2002.
- Sebastião, F. A. **VALIDAÇÃO DE TÉCNICAS MOLECULARES PARA O DIAGNÓSTICO DE BACTÉRIAS EM PEIXES, VISANDO REDUÇÃO DE TEMPO E CUSTO**. Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp Campus de Jaboticabal, 2015.
- SIQUEIRA, R. S. **Manual de Microbiologia de Alimentos**. Rio de Janeiro: EMBRAPA – CTAA. 1995.
- Śpibida, M, Krawczyk, B, Olszewski, M, Kur, J. Modified DNA polymerases for PCR troubleshooting. **J Appl Genetics** (2017) 58:133–142 DOI 10.1007/s13353-016-0371-4.
- Woodman, M.E., Savage, C.R., Arnold, W.K., and Stevenson, B. 2016. Direct PCR of intact bacteria (colony PCR). **Curr. Protoc. Microbiol.** 42:A.3D.1-A.3D.7. doi: 10.1002/cpmc.14.

**Tabela 1.** Resultados da PCR em tempo real realizada com as amostras oriundas de DNA extraído por Kit e com DNA obtido diretamente da colônia.

Amostra	CT amostra de DNA extraído por Kit	CT amostra de DNA direto da colônia
SE	18.42	18.81
SH	17.97	17.97
ST	18.44	17.75
Média	18.27	18.16



**Figura 1.** Eletroforese em gel de agarose a 1,5%. Poço 1: Marcador de 100pb, poço 2: PCR realizada com DNA de SH extraído por Kit, poço 3: PCR realizada com DNA de SH direto da colônia, poço 4: PCR realizada com DNA de ST extraído por Kit, poço 5: PCR realizada com DNA de ST direto da colônia, poço 6: PCR realizada com DNA de SE extraído por Kit, poço 7: PCR realizada com DNA de SE direto da colônia, poço 9: controle negativo.