

Área: **Microbiologia de Alimentos (Divisão K)**

DETECÇÃO DE CÉLULAS VIÁVEIS DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* POR EMA-PCR

Rosinéa Aparecida de Paula (*AgroGenética*); **Renata Flávia Ferreira E Freitas** (*AgroGenética*); **Marta Fonseca Martins Guimarães** (*Embrapa*); **Francismar Corrêa Marcelino** (*Embrapa*); **Edna Froeder Arcuri** (*Embrapa*)

Resumo

Listeria monocytogenes é considerada um dos maiores problemas de segurança alimentar, sendo que um baixo número de células pode ser capaz de iniciar a infecção em pessoas susceptíveis. Vários kits, baseados em análises de DNA, permitem a detecção desta bactéria, porém estes testes apresentam limitações uma vez que qualquer molécula de DNA alvo, tanto de células viáveis quanto de células mortas presentes numa amostra, pode ser amplificada. O corante EMA (Brometo de Etídeo Monoazida) tem sido recentemente utilizado para discriminar células viáveis de inviáveis para análise em PCR. O EMA liga-se covalentemente ao DNA de células mortas impedindo a sua amplificação pela DNA Polimerase. O objetivo deste trabalho foi determinar a concentração de EMA necessária para inibir a amplificação de DNA de células inviáveis de *L. monocytogenes* sem inibir a amplificação de DNA de células viáveis, por PCR convencional. Concentrações variadas da solução estoque de EMA (0; 0,13; 0,25; 0,5; 1 ; 3 e 5 ug/mL) foram adicionadas em microtubos contendo 500 ul de 10^8 células viáveis ou inviáveis de *L. monocytogenes* ATCC 7644 (tratamento térmico de 98 °C/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 DNA foi extraído após tratamentos subsequentes das células com proteases e fervura. As reações de amplificação continham 200 ng de DNA, 40 pmoles de cada primer (LM1 e LM2 que amplificam um fragmento de 702 pb do gene *hlyA*), 25 mM de cada dNTPs, 50 mM de MgCl₂, Tampão de PCR 1 X e 1U de Taq DNA Polimerase. Os produtos da amplificação foram analisados em gel de agarose 1,5% e corados em brometo de etídeo. Os resultados obtidos mostram que a amplificação do DNA alvo de células inviáveis foi completamente inibida quando estas foram tratadas com EMA à concentração de 1 ug/mL. As células viáveis de *L. monocytogenes* foram tratadas com EMA até a concentração de 5 ug/mL e a amplificação ocorreu em todos os tratamentos. Conclui-se que, por análise em PCR convencional, a concentração de EMA necessária para inibir a amplificação de DNA de células inviáveis de *L. monocytogenes* sem inibir a amplificação de células viáveis é de 1 ug/mL. Sendo assim, esta técnica pode ser usada para detecção apenas de células viáveis de *L. monocytogenes* presente numa amostra.

Palavras-chaves: Células viáveis, EMA-PCR, *Listeria monocytogenes*

Apoio Financeiro: FAPEMIG

Palavras-chave: Células Viáveis, EMA-PCR, *Listeria monocytogenes*