

Análise da sensibilidade analítica das técnicas de PCR convencional e em tempo real para detecção de *Salmonella*

RICHTER, P. ^{1,3} ; IKUTA, N. ^{2,3}

¹ Acadêmico do Curso de Medicina Veterinária ULBRA

² Docente ULBRA

³ Laboratório de Diagnóstico Molecular, Universidade Luterana do Brasil

INTRODUÇÃO

A *Salmonella* tem grande importância na avicultura, pois causa infecções tanto nas aves em produção como no consumidor final (homem). A *Salmonella* pertence à família Enterobacteriaceae e é um bacilo gram-negativo, anaeróbio facultativo, sendo classificada em mais de 2500 sorotipos. Os principais sorotipos que infectam aves são Gallinarum, Pullorum, Enteritidis e Typhimurium. Os sorotipos Enteritidis e Typhimurium são zoonóticos para o homem e podem ser transmitidos pelos alimentos de origem avícola. As técnicas de biologia molecular utilizadas para a detecção dessa bactéria normalmente envolvem amplificação pela reação em cadeia da polimerase (PCR), com a análise do resultado podendo ser realizada tanto em tempo real (diretamente no termociclador) como por eletroforese em gel (poliacrilamida ou agarose).

OBJETIVOS

O presente estudo objetivou comparar três formas de análise do resultado da detecção por PCR: tempo real, eletroforese em gel de agarose e eletroforese em gel de poliacrilamida a partir de amostras de *Salmonella* previamente identificadas como positivas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram obtidas 58 amostras com a provável ocorrência de *Salmonella* em diferentes meios de cultura: água peptonada (n=16), BHI (brain heart infusion) (n=8), Rappaport-Vassiliadis (n=8), sem identificação (n=26). As amostras foram isoladas de órgãos de aves (ceco, baço, gema e pulmão) de lotes de produção industrial.



Extração de DNA pelo protocolo de adsorção em sílica (NewGene Prep/PreAmp Kit – SIMBIOS Biotecnologia, Cachoeirinha – Brasil)



Amplificação por PCR em tempo real. Foram realizadas as amplificações no equipamento Veriti 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems) sendo as condições da PCR: uma desnaturação inicial de 3 minutos a 95°C seguido de 40 ciclos de 15s a 95°C, 60s a 60°C.



A avaliação em tempo real foi realizada diretamente no equipamento pela análise das curvas e determinação dos valores de Ct (*cycle threshold*). Além disso, cada amostra foi submetida à detecção em eletroforese em géis de agarose e poliacrilamida.

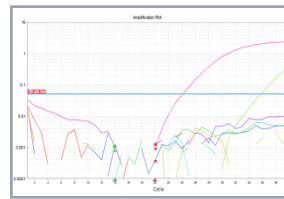


Figura 1: Detecção por RT-PCR em tempo real, gráfico de amplificação.

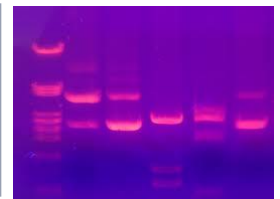


Figura 2: Gel de Agarose

RESULTADOS

Foram positivas 46 (79,3%) para o PCR em tempo real com valores de CT entre 14,4 e 34,4. Já na eletroforese de gel de poliacrilamida, 43 (74,1%) amostras se mostraram positivas enquanto na eletroforese de gel de agarose, houve apenas 36 (62%) casos positivos. Em comparação com a avaliação de PCR em tempo real, os resultados demonstraram uma frequência de 93,4% de casos positivos no gel de poliacrilamida e 78,2% no gel de agarose. A comparação com valores de Ct demonstrou que amostras superiores a 33, em geral, não foram detectadas em gel de poliacrilamida, enquanto no gel de agarose, ct's superiores a 32, não foram detectadas.

CONCLUSÃO

A avaliação em tempo real apresentou maior sensibilidade analítica do que os procedimentos de eletroforese. Já na comparação entre os dois tipos de eletroforese, a análise em poliacrilamida apresentou maior sensibilidade analítica. Em conclusão, observou-se diferença entre as formas de análise do resultado após pesquisa de *Salmonella* aviária pela técnica de PCR, sendo que o procedimento de avaliação em tempo real apresentou o melhor desempenho analítico.

REFERÊNCIAS

- F.G. Paião¹, L.G.A. Arisitides¹, L.S. Murate¹, G.T. Vilas-Bôas², L.A. Vilas-Boas², M. Shimokomaki¹. Detection of *Salmonella* spp, *Salmonella* Enteritidis and Typhimurium in naturally infected broiler chickens by a multiplex PCR-based assay. Brazilian Journal of Microbiology, xxx-xxx (2013), ISSN 1678-4405
- Kang M.-S., Kwon Y.-K., Kim H.-R., Oh J.-Y., Kim M.-J., An B.-K., Shin E.-G., Kwon J.-H., Park C.-K. Differential identification of *Salmonella* enterica serovar Gallinarum biovars Gallinarum and Pullorum and the biovar Gallinarum live vaccine strain 9R, Veterinary Microbiology V.160 P.491-495, 2012
- L. J. Richtzenhain, A. Cortez, M. B. Heinemann, R.M. Soares, S.M. Sakamoto, S. A. Vasconcellos, Z. Higa, E. Scarcelli, M. É. Genovez; A multiplex PCR for the detection of *Brucella* spp. and *Leptospiraspp*. DNA from aborted bovine fetuses. Volume 87. Pages 139-147, 2002
- Ribeiro S.A.M., Paiva J.B., Zotesso F., Lemos M.V.F., Júnior A.B. Molecular Differentiation Between *Salmonella* Enterica Subsp Enterica Serovar Pullorum and *Salmonella* Enterica Sunsp Enterica Serovar Gallinarum, Brazilian Journal of Microbiology, V.40, P.184-188, 2009