

EPAMIG

29º Congresso Nacional de Laticínios  
Instituto de Laticínios Cândido Tostes



DETECÇÃO DOS PRINCIPAIS PATÓGENOS CONTAMINANTES DE PRODUTOS  
LÁCTEOS UTILIZANDO PCR EM TEMPO REAL

Detection of main pathogen contaminants of dairy products using real-time PCR technique

Jaqueline F. O. de SÁ<sup>1</sup>  
Isabela FONSECA<sup>2</sup>  
Paulo H. F. da SILVA<sup>3</sup>  
Marta F. MARTINS<sup>4</sup>

1. Introdução

Os métodos de detecção de patógenos veiculados por alimentos, geralmente são complicados e consomem tempo. Portanto, o emprego de métodos rápidos, simples e confiáveis, é importante tanto no diagnóstico de toxi-infecção, como também, e principalmente, no controle de qualidade de alimentos (ALCOCER e OLIVEIRA, 2003). A introdução do método de PCR no diagnóstico microbiano é uma valiosa alternativa à metodologia tradicional. Rápido, com bom limite de detecção, seletivo, específico, sensível e com potencial para automatização estão entre suas grandes vantagens (MALORNY et al., 2003). O sistema *Taqman* utilizado neste estudo, utiliza sonda fluorescente, dirigida especificamente a uma região interna da sequência que se deseja amplificar e, seu uso acrescenta um nível adicional de especificidade para a reação de amplificação. Uma modificação dessa técnica que vem sendo utilizada de maneira crescente nos últimos anos para identificação bacteriana é o *multiplex* PCR, técnica na qual utilizam-se mais de um par de *primers* na mesma reação, possibilitando a amplificação simultânea de mais de uma espécie bacteriana na mesma reação PCR, promovendo uma análise mais rápida e mais barata da presença de patógenos em alimentos (GANDRA, 2006). O objetivo do presente estudo foi padronizar reações *multiplex* para a detecção dos principais patógenos contaminantes de produtos lácteos, utilizando a técnica *multiplex* PCR em tempo real.

<sup>1</sup>Mestre em Ciência e Tecnologia de Leite e Derivados, Pesquisadora e Professora da EPAMIG/ILCT, Rua Tenente Freitas, 116, Santa Terezinha, CEP 36045-560, Juiz de Fora - MG, Brasil, e-mail: jaquelinesa@epamig.br, \*Autora correspondente.

<sup>2</sup>Bolsista de Doutorado em Genética e Melhoramento do CNPQ na UFV, Viçosa - MG, Brasil, e-mail: isabela\_fonseca@yahoo.com.br.

<sup>3</sup>Doutor em Ciência dos Alimentos, Professor da UFJF, Departamento de Nutrição, Juiz de Fora - MG, e-mail: paulo.henrique@uffj.edu.br.

<sup>4</sup>Doutora em Genética e Melhoramento, Pesquisadora da Embrapa Gado de Leite, Laboratório de Genética Molecular, Juiz de Fora - MG, Brasil, e-mail: mmartins@cnpqgl.br.

## 2. Material e métodos

### 2.1. Extração de DNA

Uma colônia de cada cepa padrão (*Salmonella enterica* var Thyphimurium IAL 1472, *Staphylococcus aureus* ATCC 51651, *Escherichia coli* O157:H7 IAL 1848, *Listeria monocytogenes* ATCC 19117) foi cultivada em 5 mL de Caldo BHI (Infuso de Cérebro e Coração) e incubada a 30°C (*L. monocytogenes*) e 35°C (demais bactérias) por 18 h. O DNA foi extraído, utilizando-se o kit *Dneasy Blood & Tissue* da Qiagen e a quantificação realizada em espectrofotômetro *NanoDrop* ND-1000 e logo após, as amostras foram estocadas a -20°C até o momento do uso, quando se ajustou as concentrações de DNA.

### 2.2. Padronização das reações *monoplex* de PCR em tempo real

Os *primers* e sondas utilizados neste trabalho foram desenhados segundo indicações de literatura (PIKNOVÁ et al., 2005; SHORTLE, 1983; WANG et al., 2007; ORAVCOVÁ et al., 2006; FRICKER et al., 2007). Para uma mistura final de reação de 25 µL, utilizou-se *TaqMan Universal PCR Master Mix* (Applied Biosystems™ – by Life Technologies™) na concentração de 1X, 300 nM de sonda, diferentes concentrações de *primer* e quantidades de DNA (Tabela 1). No controle negativo foi adicionado todos os componentes da reação exceto o DNA.

**Tabela 1** - Concentrações de *primers* e DNA testadas nas reações *monoplex*.

Cepas padrão	Concentração de <i>primer</i> (nM)	Quantidade de DNA por reação	Concentração de sonda (nM)
<i>S. enterica</i>	*50, 100, 200, 300, 400, 500	50, 100, *200, 250 ng	300
<i>S. aureus</i>	50, *100, 200, 300, 400, 500	*50, 100, 200, 250 ng	300
<i>E. coli</i> O157:H7	50, 100, *200, 300, 400, 500	*50, 100, 200, 250 ng	300
<i>L. monocytogenes</i>	50, *100, 200, 300, 400, 500	50, *100, 200, 250 ng	300
IAC	50, 100, *200, 300, 400, 500	1, 5, 10, 20, 25, 40, 50 pg, *2 ng, 10 ng	300

\* Concentração ótima utilizada nas reações *multiplex*

As condições de termociclagem da PCR em tempo real foram as mesmas para todo o experimento: 50°C por 2 min e 95°C por 10 min, seguido de 40 ciclos de 95°C por 0,5 min e 60°C por 1 min. Cada amostra foi amplificada no equipamento *ABI Prism 7300 Sequence Detection Systems*. Os dados obtidos foram computados como valores de Ct e exportados em planilhas do tipo Excel.

### 2.3. Padronização das reações *multiplex* de PCR em tempo real

Definidas as concentrações ótimas de *primers* e a quantidade de DNA nas reações *monoplex* (Tabela 1), prosseguiu-se com as reações *multiplex*. O *multiplex* 1 para detecção de *S. enterica* e *S. aureus* e o *multiplex* 2 para detecção de *L. monocytogenes* e *E. coli* O157:H7, ambos contendo IAC. As condições de termociclagem e volume das reações foram as mesmas das reações *monoplex*.

### 3. Resultados e discussão

Neste experimento, variou-se a concentração de *primers* e de DNA bacteriano de cepas padrão e, assim foram padronizadas as reações *monoplex*. As reações *monoplex* contendo DNA, sonda e o par de *primer* desenhados para cada uma das bactérias, funcionaram bem, pois, houve amplificação de todos os produtos esperados. Posteriormente, foram testadas duas reações *multiplex* (*multiplex* 1 e *multiplex* 2), porém, apenas o *multiplex* 1 foi eficiente como pode ser observado pela Figura 1, onde a curva de amplificação ultrapassou o limiar de detecção do equipamento (*threshold* - linha verde) indicando a amplificação dos produtos esperados. Para *multiplex* 2 não foi obtido nenhum produto de amplificação.

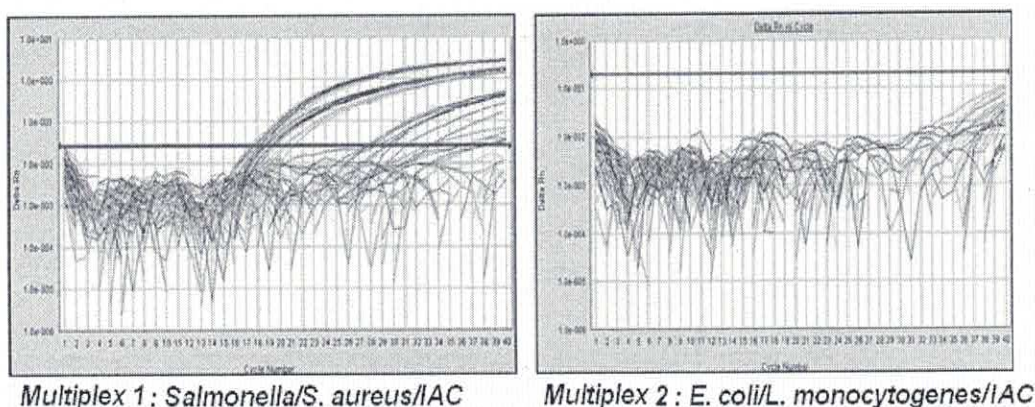


Figura 1 - Perfil de amplificação dos *Multiplex* 1 e 2.

No *multiplex* 1, cepas padrão de *S. aureus* e *Salmonella enterica* var *Thyphimurium* foram detectados simultaneamente em menos de 24 h. Pela metodologia clássica, para se obter a confirmação da presença destes patógenos levaria 4 e 7 dias, respectivamente. Certamente, a sua introdução plena na indústria

de alimentos vai exigir a disponibilidade de forma adequada de pessoal treinado e a adaptação dos protocolos descritos na literatura científica para a prática cotidiana de análises laboratoriais. É de importância vital para a expansão do uso de PCR na indústria de alimentos que os métodos, de extração de ácidos nucleicos, de quantificação e de multiplexação, sejam validados e padronizados.

#### 4. Conclusões

Padronizou-se um *multiplex* PCR em tempo real para detecção simultânea de *Salmonella enterica* var Thyphimurium e *Staphylococcus aureus*.

#### ABSTRACT

The objective of this study was set up multiplex reactions to simultaneous detection of *Salmonella enterica* var Thyphimurium and *Staphylococcus aureus* (multiplex 1) and *Listeria monocytogenes* and *E. coli* O157: H7 (multiplex 2), using real-time PCR technique. A multiplex reaction was establishing for detection of *Salmonella enterica* var Thyphimurium and *Staphylococcus aureus*.

#### Referências bibliográficas

ALCOCER, I.; OLIVEIRA, C. R. M. Detecção rápida de *Salmonella enteritidis* em alimentos por ensaio imunoenzimático ELISA. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, n. 3, p. 401 - 408.

FRICKER, M.; MESSELHAUBER, U.; BUSCH, U.; SHERER, S.; EHLING-SCHULZ, M. Diagnostic real-time PCR assays for the detection of emetic *Bacillus cereus* strains in foods and recent foodborne outbreaks. **Applied and Environmental Microbiology**, n. 73, p. 1982-1998, 2007.

GANDRA, E. A. **Multiplex PCR para detecção de *S. aureus*, *S. intermedius* e *S. hyicus* em leite UHT artificialmente contaminado**. 2006. 69f. Tese 16S – *S. warneri* 16S – *S. lugdunensis* (Doutorado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) - Faculdade de Agronomia "Eliseu Maciel", UFPel, Pelotas, 2006.

MALORNY, B.; TASSIOS, P. T.; RADSTRÖM, P.; COOK, N.; WAGNER, M.; HOORFAR, J. Standardization of diagnostic PCR for the detection of foodborne pathogens. **International Journal of Food Microbiology**, v. 83, p. 39-48. 2003.

ORAVCOVÁ, K. Detection and quantification of *Listeria monocytogenes* by 5' -nuclease polymerase chain reaction targeting the *actA* gene. **Letters in Applied Microbiology**, n. 42, p. 15-18, 2006.

PIKNOVÁ L.; KACLÍKOVÁ, E.; PANGALLO, D.; POLEK, B. KUČHTA, T. Quantification of *Salmonella* by 5' -nuclease real-time polymerase chain reaction targeted to *fimC* gene. **Current Microbiology**, n. 50, p. 38-42, 2005.

SHORTLE, D. A genetic system for analysis of staphylococcal nuclease. **Gene**, n. 22, p. 181-182, 1983.

WANG, L.; LI, Y.; MUSTAPHA, A. Rapid and simultaneous quantitation of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* and *Shigella* in ground beef by multiplex real-time PCR and immunomagnetic separation. **Journal of Food Protection**, n. 70, p. 1366-1372, 2007.



ISSN 2176-0810

**Anais do  
29º Congresso Nacional de Laticínios**

**16 a 19 de Julho de 2012**  
Juiz de Fora - Minas Gerais



AGRICULTURA,  
PECUÁRIA E  
ABASTECIMENTO

