

Universidade de Lisboa  
Faculdade de Ciências  
Departamento de Biologia Vegetal



# **Desenvolvimento de Métodos Moleculares para Avaliação da Qualidade e Segurança Microbiológica em Produtos Alimentares**

**Maria do Carmo de Sousa Uva da Cunha Passo**

Mestrado em Microbiologia Aplicada

Ano 2008/2009

Universidade de Lisboa  
Faculdade de Ciências  
Departamento de Biologia Vegetal



# **Desenvolvimento de Métodos Moleculares para Avaliação da Qualidade e Segurança Microbiológica em Produtos Alimentares**

**Maria do Carmo de Sousa Uva da Cunha Passo**

Mestrado em Microbiologia Aplicada

Ano 2008/2009

Trabalho de Projecto orientado por:

Professor Doutor Mário João Gadanho, Orientador Externo e, pelo  
Professor Doutor Rogério Paulo de Andrade Tenreiro, Orientador Interno

Agradecimentos: Aos meus Pais, aos meus Irmãos.

# ÍNDICE

<b>Índice</b> .....	<b>1</b>
<b>Introdução</b> .....	<b>4</b>
1. História da microbiologia alimentar.....	4
2. Microrganismos patogénicos de maior importância.....	5
3. ISO (Organização Internacional para Standardização).....	10
4. Técnica molecular de PCR.....	11
<b>Material e Métodos</b> .....	<b>15</b>
1. Lista de Culturas.....	15
2. Procedimentos de Crescimento de Organismos segundo Normas ISO.....	16
3. Detecção Molecular .....	17
<b>Resultados e Discussão</b> .....	<b>21</b>
1. Detecção de <i>Campylobacter</i> sp	
1.1. <u>Detecção de <i>Campylobacter</i> sp</u> .....	21
1.2. <u>Determinação de temperatura óptima de annealing</u> <u>para detecção de <i>Campylobacter</i> sp</u> .....	22
1.3. <u>Verificação da especificidade do par de primers</u> .....	22
2. Detecção de <i>Bacillus cereus</i>	
2.1. <u>Determinação da temperatura óptima de annealing</u> <u>para detecção de <i>Bacillus cereus</i></u> .....	23
2.2. <u>Verificação da especificidade do par de primers</u> .....	23
2.3. <u>Detecção de <i>Bacillus cereus</i> a partir de cultura</u> .....	24
3. Detecção de <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	
3.1. <u>Determinação da temperatura óptima de annealing</u> <u>para detecção de <i>Vibrio parahaemolyticus</i></u> .....	24
3.2. <u>Verificação da especificidade do par de primers</u> .....	25
3.3. <u>Identificação de amostras desconhecidas</u> .....	25

4.	Detecção de <i>Vibrio cholerae</i>	
4.1.	<u>Determinação da temperatura óptima de annealing para detecção de <i>Vibrio cholerae</i></u> .....	26
4.2.	<u>Verificação da especificidade do par de primers</u> .....	26
4.3.	<u>Identificação de amostras desconhecidas</u> .....	26
4.4.	<u>Identificação de amostras desconhecidas a partir da conjugação dos pares de primers de <i>Vibrio parahaemolyticus e cholerae</i></u> .....	27
5.	Detecção de <i>Listeria monocytogenes</i>	
5.1.	<u>Determinação da temperatura óptima de annealing para detecção de <i>Listeria monocytogenes</i></u> .....	28
5.2.	<u>Verificação da especificidade do par de primers</u> .....	28
5.3.	<u>Identificação de amostras desconhecidas</u> .....	28
5.4.	<u>Identificação de <i>Listeria monocytogenes</i> de acordo com norma e por DNA de cultura</u> .....	29
6.	Detecção de <i>Salmonella sp</i>	
6.1.	<u>Determinação da temperatura óptima de annealing para detecção de <i>Salmonella sp</i></u> .....	30
6.2.	<u>Verificação da especificidade do par de primers</u> .....	30
6.3.	<u>Identificação de amostras desconhecidas</u> .....	30
6.4.	<u>Identificação de amostras a partir da conjugação dos pares de primers de <i>Salmonella sp e Listeria monocytogenes</i></u> .....	31
7.	Detecção de <i>Escherichia coli</i> O157:H7	
7.1.	<u>Par de primers O157RFbE_F/O157RFbE_R</u>	
7.1.1.	<u>Determinação da temperatura óptima de annealing para detecção de <i>E. coli</i> O157:H7</u> .....	32
7.1.2.	<u>Verificação da especificidade do par de primers</u> .....	32
7.1.3.	<u>Identificação de amostras desconhecidas</u> .....	33
7.1.4.	<u>Verificação da presença do factor de virulência O157:H7</u> .....	33
7.2.	<u>Par de primers Stx1F/Stx1R</u>	
7.2.1.	<u>Verificação da temperatura óptima de annealing</u> .....	34
7.2.2.	<u>Verificação da presença do factor de virulência Stx1</u> .....	34
7.3.	<u>Par de primers EaeF/EaeR</u>	
7.3.1.	<u>Verificação da temperatura óptima de annealing</u> .....	35
7.3.2.	<u>Verificação da presença do factor de virulência Eae</u> .....	35

---

7.4	<u>Par de primers H7flicF/H7flicR</u>	
7.4.1	<u>Verificação da temperatura óptima de annealing.....</u>	<b>36</b>
7.4.2	<u>Verificação da presença do factor de virulência H7flic.....</u>	<b>36</b>
7.4.3	<u>Duplex com H7flicF/H7flicR e EaeF/EaeR.....</u>	<b>37</b>
8.	Escolha de Primers Universais.....	<b>37</b>
9.	Detecção Simultânea de Microrganismos por PCR Multiplex	
9.1.	<u>Primers Universais e Primers Específicos.....</u>	<b>38</b>
9.2.	<u>Conjugação de pares de primers específicos.....</u>	<b>40</b>
	<b>Conclusão</b> .....	<b>44</b>
	<b>Referências Bibliográficas</b> .....	<b>48</b>

# INTRODUÇÃO

## **1- História da Microbiologia Alimentar**

Os ancestrais do homem já tinham conhecimento, não científico, de que os alimentos tinham de ser consumidos sob determinadas condições e que, se assim não fosse, ficariam à mercê das doenças associadas. Assim, e através da observação, perceberam que para contrariar o processo de degradação dos alimentos podiam utilizar o gelo, o sal ou o fogo para os preservar e tornar mais seguros <sup>(1)</sup>.

Em 1875, Louis Pasteur (1822-1895) descobriu que o processo de fermentação do vinho a partir das uvas se devia à acção de microrganismos. Descobriu, ainda, que os processos de putrefacção do leite e da carne também estavam associados a microrganismos, mas neste caso ao seu crescimento. Mais tarde mostrou a associação entre esses microrganismos e doenças graves causadas em humanos <sup>(1)</sup>.

Robert Koch (1843-1910), em 1880 desenvolveu técnicas de plaqueamento em agar para isolamento de bactérias em culturas puras e determinação do número de microrganismos numa amostra <sup>(1)</sup>.

Antes de 1970, a microbiologia alimentar era vista como uma ciência aplicada, maioritariamente envolvida no controlo da qualidade microbiológica dos alimentos. Desde aí as tecnologias dos processos de produção, processamento, distribuição e consumo alimentares mudaram drasticamente.

Nos dias que correm é necessário incluir uma grande parte de ciência básica para perceber e resolver eficazmente os problemas microbiológicos associados a alimentos. Esta disciplina inclui não só aspectos microbiológicos de contaminação alimentar, doenças associadas, o seu controlo efectivo e bioprocessamento dos alimentos, mas também informação básica de microbiologia ecológica, fisiologia, metabolismo e genética <sup>(1)</sup>.

Esta informação tem ajudado no desenvolvimento de métodos de detecção rápida e eficaz de bactérias patogénicas e contaminantes, de estirpes microbianas por tecnologia de DNA recombinante, produção de alimentos fermentados de melhor qualidade, enzimas termo-estáveis no processo enzimático alimentar, métodos de remoção de bactérias em alimentos e superfícies de equipamentos e combinar vários

métodos de controlo, para este ser efectivo em microrganismos patogénicos e contaminantes em alimentos.

## 2- Microrganismos Patogéneos de Maior Importância

Foi definido um grupo de microrganismos, de maior importância, no que toca a contaminações alimentares e doenças associadas. São eles <sup>(4)</sup>:

- *Escherichia coli* O157:H7   - *Salmonella* sp   - *Listeria monocytogenes*
- *Campylobacter* sp   - *Vibrio cholerae* e *parahaemolyticus*
- *Bacillus cereus*

### **Escherichia coli**

Descoberta em 1885, é uma bactéria Gram negativa, móvel, não esporulada, de micromorfologia bacilar, anaeróbica facultativa e um habitante normal da flora intestinal do homem.

Desde meados de 1940, que há evidências de que algumas estirpes desta bactéria causam diarreia, principalmente em crianças. Foram por isso designadas de estirpes enteropatogénicas. No entanto, novos resultados mostraram que estas estirpes patogénicas pertenciam a mais do que um tipo, tendo por isso, sido subdivididas em subgrupos <sup>(5)</sup>:

- Enteropatogénica   - Enterotoxigénica   - Enteroagregativa
- Enterohemorrágica

O grupo de maior relevância é o das estirpes enterohemorrágicas, cujo serótipo principal é o O157:H7. Causa diarreia sanguinolenta severa, (colite hemorrágica) e síndrome urémico hemorrágico, (HUS), em humanos. A ingestão de 10 a 100 células podem levar a doença, existindo três enterotoxinas, verotoxinas, produzidas por este serótipo que causam sintomas de doença.

Este serótipo, ao contrário de outras *Esc. coli*, não fermenta o sorbitol, nem possui acção enzimática da glucuronidase. Cresce rapidamente entre 30 e 42°C.

Existem estirpes resistentes a pH 4,5 ou mais baixo. Estes microrganismos são eliminados por processo de pasteurização e sobrevivem nos alimentos a -20°C.

Produzem uma toxina semelhante à toxina shiga, podendo estar envolvidos na doença mais do que uma toxina. Provavelmente as células colonizam o intestino por aderência às células epiteliais, produzindo de seguida as toxinas que actuam no cólon. Estas também são absorvidas por via sanguínea, destruindo pequenos vasos do intestino, rins e cérebro <sup>(2 e 4)</sup>.

### **Salmonella sp**

Antes de 1940 era considerada a maior causa de contaminação alimentar a nível mundial.

Após o desenvolvimento de técnicas de isolamento e identificação, tornou-se evidente que a sua incidência mundial era bastante elevada.

Este número, por incrível que pareça, tem vindo sempre a aumentar, podendo estar relacionado com quatro factores:

- 1- Aumento do número de isolados de *Salmonella sp* resistentes a antimicrobianos;
- 2- Aumento do número de indivíduos imunodeficientes, extremamente susceptíveis a este microrganismo;
- 3- Aumento da contaminação de ovos associada a *Salmonella enteridis*;
- 4- Produção alimentar em grandes centros, onde pode ocorrer contaminação por *Salmonella sp* e que se dissemina com grande facilidade.

São microrganismos Gram negativos, não esporulados, aeróbios facultativos e móveis. Quando crescem em meio com glucose formam gás, normalmente fermentam dulcitol, mas não a lactose. Utilizam citrato como fonte de carbono, produzem sulfato de hidrogénio, lisina descarboxilato e ornitina, sendo negativas quanto à acção de urease.

Fazem parte da flora intestinal normal de alguns animais, como insectos, pássaros e animais domésticos. Nestes causam salmonelose, podendo depois manter-se no animal, tornando-o apenas portador da bactéria. Os humanos podem tornar-se portadores da bactéria após uma infecção provocada pela mesma.

Após a sua ingestão invadem a mucosa do intestino delgado proliferando nas células epiteliais, produzindo a toxina. Deste processo resulta uma reacção inflamatória e acumulação de fluido no intestino. A habilidade de invasão e de causar patogenicidade deve-se à produção de um factor citotóxico termo-estável.

Uma vez dentro das células epiteliais ocorre multiplicação do organismo patogéneo e produção da enterotoxina termo-lábil, directamente relacionada com a secreção de fluidos e electrólitos <sup>(2 e 4)</sup>.

Os métodos de detecção envolvem pré-enriquecimento da amostra, em meio nutritivo, seguido de enriquecimento selectivo, plaqueamento em meio agár selectivo-diferencial e confirmação por testes bioquímicos e serológicos <sup>(6 e 7)</sup>.

### **Listeria monocytogenes**

A listeriose humana é conhecida há bastante tempo, no entanto, a associação entre a presença deste microrganismo em alimentos e manifestação de doença após o seu consumo é bastante recente. É considerado por alguns como infecção oportunista, no entanto, pode ser fatal para alguns indivíduos, como imunodeficientes, grávidas, recém-nascidos e crianças. Possui uma grande habilidade de crescimento em alimentos que se encontram a temperaturas refrigeratórias, como por exemplo em alimentos que são cozinhados e depois mantidos durante longos períodos em frigoríficos. Consegue passar de um baixo nível inicial para um nível de dose infecciosa, durante o período de armazenamento destes alimentos. O aumento de consumo de alimentos prontos a comer, que são armazenados por longos períodos, aos quais não se dá o necessário tempo de aquecimento por microondas, eleva as probabilidades de infecção pelo microrganismo.

É uma bactéria Gram positiva, psicrotrófica, anaeróbica facultativa, não esporulada, móvel. É hemolítica e fermenta a ramnose e a glucose, esta última sem formação de gás, mas não fermenta a xilose.

Cresce entre 1 e 44°C, com intervalo óptimo entre 35 e 37°C. É sensível a temperaturas de pasteurização, mas quando dentro de células sanguíneas são requeridas temperaturas superiores para a sua destruição.

O seu factor de virulência é uma hemolisina específica, listeriolisina O. Esta é produzida durante o crescimento exponencial celular. A bactéria invade diferentes tecidos do corpo, multiplicando-se dentro das células, local onde liberta a toxina.

Devido à sua presença ubiqüitária não é possível ter alimentos completamente livres deste organismo patogéneo. Contudo nalguns países foi imposto, por agências e indústrias regulatórias, um programa de controlo nos centros de produção comercial. Em adição a este programa foram também fornecidas medidas ao consumidor,

algumas com especial atenção aos indivíduos de alto risco, com o intuito de redução da listeriose com origem alimentar <sup>(2)</sup>.

Os métodos de detecção são os mesmos que os utilizados para a detecção de *Salmonella sp*, consistindo num pré-enriquecimento das amostras em meio nutritivo, seguido de enriquecimento selectivo, plaqueamento em meio agár selectivo-diferencial e confirmação por testes bioquímicos e serológicos <sup>(2 e 4)</sup>.

### **Campylobacter sp**

Muitas espécies de *Campylobacter* são capazes de causar gastroenterite humana, sendo as espécies *Campylobacter jejuni* e *coli* as que mais se destacam a nível mundial.

São bactérias Gram negativas, móveis, não esporuladas, de forma espiral arredondada, são oxidase e catalase positivas. São microaerófilas, necessitando de um ambiente com 5% de oxigénio, 8% de dióxido de carbono e 87% de azoto para crescimento. As temperaturas de incubação variam entre os 32 e os 45°C. Preferem ambientes constituídos por aminoácidos aos de por carboidratos. Têm um crescimento lento e não são um organismo muito competidor na presença de outras bactérias. São sensíveis a alguns parâmetros ambientais como teor de oxigénio no ar, cloreto de sódio, baixo pH, (abaixo de 5.0), temperatura (abaixo de 30°C), calor (temperaturas de pasteurização) e secura. No entanto, sobrevivem nos alimentos sob refrigeração e mantêm-se viáveis durante meses no estado congelado.

*Campylobacter sp* é uma bactéria entérica do organismo. Possui uma toxina termo-lábil, responsável pelos sintomas da doença entérica. Produz ainda um factor que permite a invasão e estabelecimento nas células epiteliais, tanto no intestino delgado como no grosso <sup>(2 e 4)</sup>.

### **Vibrio sp**

Existem duas estirpes com maior relevância, *Vibrio parahaemolyticus* e *cholerae*.

### **Vibrio parahaemolyticus**

Esta é bastante comum no Japão, contando com 40 a 70% do total de doenças provocadas por contaminação alimentar. Esta incidência está relacionada com o consumo de alimentos crus de origem marinha.

É uma bactéria Gram negativa, não esporulada, móvel. É geralmente oxidase e catalase positiva. Cresce em meio com glucose, sem produção de gás associada, mas não fermenta a lactose ou a sucrose. Cresce a temperaturas entre os 5 e os 42°C, com intervalo óptimo entre os 30 e 37°C. Tolerar concentrações de cloreto de sódio até 5%, ficando mais sensível quando estas atingem valores de 10%. Não se desenvolve a pH 5.0 ou inferior e, é extremamente sensível à secura, pasteurização, refrigeração e congelamento.

Nem todas as estirpes desta espécie são patogénicas, no entanto as que são, causam hemólise, devido à presença de uma hemolisina termo-estável, designada como Kanagawa-positiva. Acontece que as estirpes isoladas de fontes naturais são Kanagawa-negativas, mas patogénicas. Pensa-se que a toxina utilizada pela bactéria é a TDH, hemolisina directa termo-estável.

Todas as estirpes patogénicas aderem às células epiteliais do intestino humano. Os níveis de toxina produzidos estão directamente relacionados com o crescimento e concentração celular e pH do ambiente. A partir do momento em que a toxina é formada esta não é destruída por acção do calor <sup>(2 e 4)</sup>.

### *Vibrio cholerae*

É o agente responsável pela cólera, doença não contagiosa, mas que leva a grandes epidemias, sendo altamente mortal. Em 1911 pensava-se que esta doença fora erradicada, no entanto reapareceu em países asiáticos e africanos.

Tal como as outras bactérias pertencentes ao género *Vibrio*, esta espécie é Gram negativa, móvel e de forma vírgula, ou vibrião. Existem vários serótipos, estando as estirpes 01 associadas à cólera epidémica. A sua temperatura óptima de crescimento situa-se entre os 30 e 35°C, no entanto sobrevivem bem em alimentos cozinhados mantidos entre 5 e 10°C. Alimentos alcalinos, com valores de pH superiores a 7, como a batata e a banana favorecem o seu desenvolvimento.

A toxina produzida pelo serótipo 01 é termo-estável, uma proteína citotóxica, com duas unidades funcionais. A subunidade A activa estimula a adenil ciclase nas células epiteliais do intestino, levando a uma secreção massiva de água com clorito, potássio e bicarbonato.

Nas estirpes serótipo não 01, estas produzem uma citotoxina e uma hemolisina. Após a ingestão da bactéria, em número suficiente, aquelas colonizam o

intestino delgado multiplicando-se rapidamente e produzem toxinas, que são libertadas quando as células morrem e lisam.

Os seus métodos de detecção incluem um pré-enriquecimento inicial em água peptonada alcalina, seguida de plaqueamento em meio de agár selectivo. As colónias suspeitas são sujeitas a testes serológicos e bioquímicos, para confirmação <sup>(3)</sup>.

### **3- ISO (Organização Internacional para Standardização)**

Nos rótulos dos produtos alimentares vem mencionado que determinado produto foi sujeito a rigorosos testes de qualidade. Estes identificam e verificam se um produto está nas devidas condições para ser comercializado. Estes critérios, denominados critérios de qualidade, variam de país para país, através da publicação de decretos-lei ou portarias.

No entanto existe uma entidade, a ISO (Organização Internacional para Standardização), que estipula os critérios de higiene e segurança em vários alimentos e, também, os métodos a utilizar para realizar as respectivas análises. Estes são emitidos sob forma de directivas ou regulamentos no Jornal Oficial da Comunidade, sendo o regulamento em vigor na actualidade o 1441/2007.

Esta organização já existe em 162 países, na base de um membro por país, com um secretariado central em Genebra, Suíça, que coordena o sistema.

É uma organização não governamental, que faz a ponte entre os consumidores e os sectores privados e de produção. Permite a chegada a um consenso entre duas faces, a relativa ao negócio e a relativa às necessidades de uma sociedade. A standardização assegura as características ideais tanto de produtos, como de serviços no que respeita à qualidade, segurança, métodos ecológicos de produção, eficiência, transferência e preço de comercialização adequado <sup>(11)</sup>.

Todos os testes definidos por estas normas incluem:

- 1- Plaqueamento do microrganismo em questão em meio de cultura adequado;
- 2- Confirmação de que se trata do microrganismo em questão, isto com a ajuda de testes bioquímicos e serológicos descritos nas normas existentes para cada microrganismo.

Naturalmente que estes testes variam consoante os microrganismos. Existem microrganismos para os quais são necessários realizar enriquecimentos selectivos,

para crescimento do microrganismo alvo de estudo. Nalguns casos, para além deste enriquecimento é realizado um pré enriquecimento.

Acontece que, nas normas definidas por esta organização, os testes para detecção dos organismos patogêneos apenas têm como base a microbiologia clássica. No entanto já começam a aparecer normas de biologia molecular para pesquisa microbiológica em alimentos, embora ainda nos encontremos numa fase muito inicial da sua publicação.

#### **4- Técnica Molecular de PCR**

A rápida e elevada emergência de novas contaminações alimentares leva-nos a pensar se estas técnicas de detecção serão suficientes e eficientes. Será a microbiologia clássica rápida e eficaz neste processo? Poderão outros métodos, como os moleculares, por exemplo, ser mais adequados?

Normalmente estes testes, em microbiologia clássica, nunca estão concluídos em menos de 6 dias, na melhor das hipóteses, o que torna moroso todo o processo relativamente às necessidades dos dias que correm.

Propõem-se então a realização de ensaios a partir da técnica de PCR, (uma forma fácil de rápida amplificação de sequências específicas de DNA alvo), sendo a determinação de presença/ausência destes microrganismos mais fácil e a metodologia cada vez mais usual <sup>(14; 15; 16)</sup>.

Até aos anos de 1980, antes da descoberta da técnica de PCR, este tipo de testes era feito por métodos bacteriológicos de enriquecimento e isolamento do organismo de amostras clínicas ou alimentares, sendo feitos, posteriormente, testes adicionais bioquímicos e/ou imunológicos, para confirmação da identidade do organismo, métodos acima mencionados e sugeridos pelas normas da ISO <sup>(2)</sup>.

Com a descoberta e completação de vários genomas bacterianos, passou a ter-se conhecimento da base genética de fenótipos úteis para a distinção entre organismos patogénicos e comensais, com relações genéticas próximas e com o mesmo habitat.

A partir da técnica de PCR, fragmentos específicos de DNA são amplificados durante um processo cíclico de três passos <sup>(14; 15 e 16)</sup>:

- 1- O DNA alvo, ou seja, aquele que queremos amplificar, é desnaturado a altas temperaturas;

- 2- Dois oligonucleótidos sintéticos, denominados Primers, são ligados a cadeias opostas, a uma temperatura que apenas permite a hibridação ao alvo correcto;
- 3- É feita a polimerização, de DNA pela enzima DNA polimerase, com os oligonucleótidos como primers e o DNA alvo como molde.

Sendo este processo repetido inúmeras vezes é obtida uma amplificação exponencial do DNA ladeado pelos dois oligonucleótidos.

Em primeiro lugar tem de ser escolhida uma boa amostra para detecção por PCR.

Após a escolha de uma boa amostra, há que ter conhecimento se o organismo contamina o alimento em altas concentrações ou se, pelo contrário, é necessário um enriquecimento de cultura prévio para uma amplificação do número de células bacterianas. Estes pré-enriquecimentos levam a que as bactérias sejam detectadas mais rapidamente por PCR, do que por métodos bacteriológicos standard, isto porque se tratam de resultados qualitativos, (presença/ausência) e não quantitativos, (ufc/g). Este factor torna a escolha da amostra ainda mais importante, visto que só o facto de o organismo estar presente é relevante, independentemente da quantidade de células (13).

Depois de se ter amostra em quantidade há que preparar o template a usar, seja de DNA ou de RNA.

O primeiro passo é a ruptura celular, para que o ácido nucleico possa ser libertado. Este processo vai variar com o tipo de microrganismo com que se trabalha.

O passo seguinte é o processamento da amostra, de forma a concentrar o template e reduzir a concentração de inibidores de PCR. Pode ser feito por centrifugação, cultura de enriquecimento (1<sup>a</sup> ou 2<sup>a</sup>, dependendo se já foi feita uma para aumentar o número de organismos patogéneos), imunocaptura e, ainda, centrifugação de densidade Buoyant. Salienta-se o facto de que já existem Kits de extracção de DNA, específicos para amostras alimentares, levando à eliminação de forma fácil os factores inibitórios produzidos por alguns alimentos.

Para cada tipo de alimento com que se trabalha há que seguir um determinado protocolo, de forma a serem eliminados o maior número possível de inibidores de reacção. Estes inibidores são substâncias que se ligam, ou degradam, um componente da reacção, fazendo com que esta não entre na síntese do DNA. Neste

grupo estão incluídos quelantes de cátions e substâncias de ligação ou degradação da polimerase ou o template de DNA.

Não podemos, no entanto, considerar a técnica de PCR, ou outra técnica molecular qualquer que seja, uma substituta das técnicas convencionais de microbiologia. Porém, as razões pelas quais esta técnica deve ser aplicada, tal como qualquer outra técnica molecular, são:

- Simplicidade
- Processamento
- Custo
- Rapidez
- A técnica mais indicada

A microbiologia clássica necessita de menos técnica do que um PCR, mas esta última, além de fácil aprendizagem, requer menos tempo para adquirir as competências necessárias, isto é, certeza no trabalho final. Tal não acontece na microbiologia clássica. Para se poder atingir as devidas competências e correctas interpretações são necessários muito treino, experiência e conhecimentos prévios em microbiologia <sup>(6)</sup>.

Ao longo dos anos os reagentes moleculares tornaram-se mais baratos, de mais fácil obtenção e com prazos de validade mais alargados. Embora os dois primeiros parâmetros variem com a localização <sup>(13)</sup>.

A técnica de PCR tornou-se mais reconhecida pelo seu potencial como fonte alternativa a métodos de cultura, na busca de microrganismos patogéneos alimentares.

Tem como principais vantagens a sua especificidade e rapidez, comparadas com técnicas culturais tradicionais. Contudo a sensibilidade vai variar com a matriz alimentar envolvida. Devido à complexidade desta última, muitos compostos nos alimentos são inibitórios às reacções de PCR. Para contrariar este aspecto, muitas vezes as amostras alimentares são enriquecidas antes dos passos de amplificação. Assim, além de haver um aumento do número de microrganismos alvo, há um aumento de sensibilidade de detecção e uma ajuda na redução do risco de amplificação de ácidos nucleicos de células mortas ou não viáveis <sup>(12)</sup>.

No caso das células mortas, os enriquecimentos selectivos permitem que só as células vivas sejam alvo de detecção, evitando resultados falsos positivos. No caso das células viáveis, mas não cultiváveis, estas podem causar infecção e apesar de não serem detectadas nos enriquecimentos selectivos, podem sê-lo por PCR, apresentando assim mais uma vantagem de utilização desta técnica <sup>(7)</sup>.

A detecção da reacção pode ser feita de várias formas. Uma delas, mais comum, é a colocação da amostra em gel de agarose, sendo os fragmentos, se presentes, separados por electroforese baseada no tamanho das amostras. O gel de agarose e o tampão de electroforese contêm brometo de etídio, (EtBr), que se liga à dupla cadeia de DNA originando fluorescência sob luz ultra violeta.

Na interpretação dos resultados desta técnica, podemos dizer que uma amostra é positiva quando um fragmento é produzido, com o tamanho esperado, de acordo com os Primers usados. Se o seu tamanho for superior ou inferior do esperado a amostra deverá ser negativa, (amplificação inespecífica). É assim utilizado um marcador de pesos moleculares standard, que funciona como padrão, ajudando na verificação do tamanho dos fragmentos e uma amostra já conhecida, denominada controlo positivo, utilizada como termo de comparação.

Existem ainda outros parâmetros a considerar tais como a percentagem de agarose utilizada no gel ou o tempo de electroforese, pois estes vão influenciar a separação dos fragmentos <sup>(12)</sup>.

## MATERIAL e MÉTODOS

### 1- Lista de Culturas

As tabelas abaixo indicam as culturas de microrganismos e os DNA's utilizados nos ensaios de especificidade de Primers.

**Tabela 1 – Lista de microrganismos, meios de culturas e temperaturas de crescimento, aplicadas durante o estudo.**

<u>Microrganismo</u>	<u>Meio de Cultura</u>	<u>Temperatura de Crescimento</u>
<i>Salmonella sp</i>	XLD	37°C
<i>Listeria monocytogenes</i>	Palcam	37°C
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	TBX	44°C
<i>Bacillus cereus</i>	BCA/PCA	30°C
<i>Vibrio cholerae</i> e <i>V. parahaemolyticus</i>	TCBS	37°C
<i>Staphylococcus aureus</i>	MSA	37°C
<i>Enterococcus sp</i>	BEA	37°C
<i>Enterobacter sp</i>	PCA	30°C

Tabela 2 - Lista de DNA's utilizados nos ensaios de especificidade de Primers

<u>DNA concentrado para ensaios de especificidade (1 a 9)</u>	<u>DNA concentrado para ensaios de especificidade (11 a 18)</u>
<i>Leuconostoc sp</i>	<i>Bacillus sp</i>
<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Chlamydia sp</i>
<i>Haemophilus ducrei</i>	<i>Haemophilus influenza</i>
<i>Serratia sp</i>	<i>Salmonella sp</i>
<i>Morganella sp</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
<i>Mycoplasma sp</i>	<i>Escherichia coli O157:H7</i>
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Vibrio cholerae</i>
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
<i>Streptococcus pyogenes</i>	<i>Bacillus cereus</i>

## 2- Procedimentos de Crescimento de Organismos Segundo Normas ISO

Como referido na introdução a ISO, (Organização Internacional para Standardização), estipula métodos a utilizar para a realização das análises alimentares.

Assim, os microrganismos sujeitos a testes a partir de cultura foram crescidos segundo estas normas, tal como os esquemas abaixo indicam.

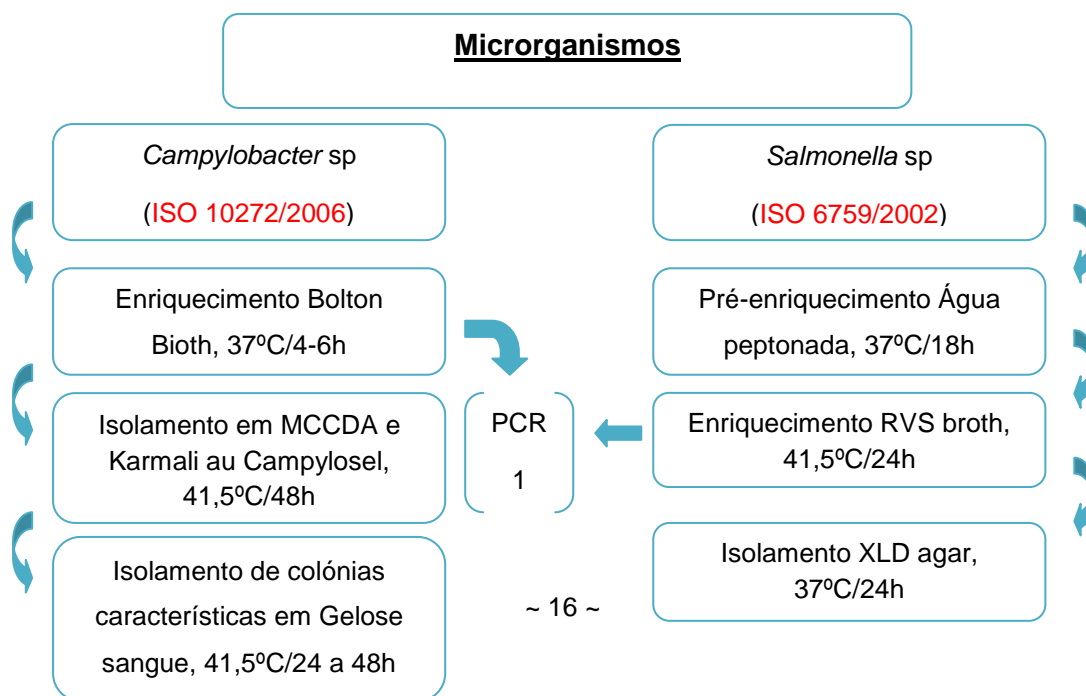


Figura 1- Crescimento de *Campylobacter* sp e *Salmonella* sp segundo normas ISO.

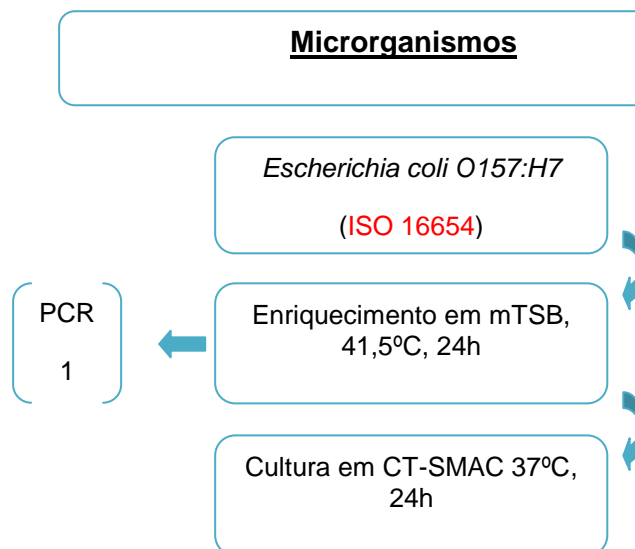
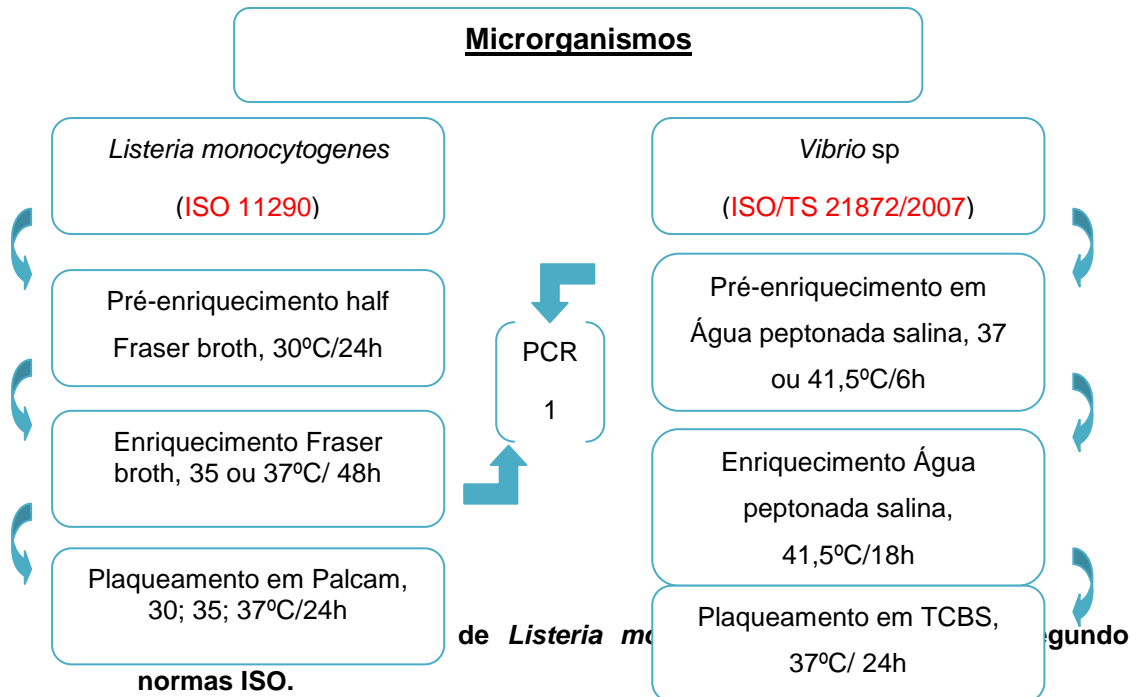


Figura 3- Crescimento de *E. coli* O157:H7 segundo norma ISO.

Todos estes microrganismos, no passo imediatamente antes de serem plaqueados ou isolados, são sujeitos a testes de PCR, (PCR 1), tal como indicado nas figuras. A partir do enriquecimento era retirado 1ml para extracção de DNA utilizando o método de Pitcher.

### 3- Detecção Molecular

Os Primers utilizados foram os seguintes:

**Tabela 3 – Primers Específicos Testados**

<u>Microrganismo</u>	<u>Primer</u>
<i>Salmonella</i> sp	Sal1F/Sal1R
<i>Listeria monocytogenes</i>	Lmon218F/Lmon857R
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	O157RFbE_F/O157RFbE_R
<i>Campylobacter</i> sp	Campylo1F/Campylo1R
<i>Bacillus cereus</i>	BcergyrF/BcergyrRev1
<i>Vibrio cholerae</i>	ToxF/ToxR
<i>Vibrio parahaemoliticus</i>	TIhF/TIhR

**Tabela 4 - Conjunto de Primers universais utilizados**

<u>Primers Universais</u>
Pa/907R
Pa/1114R
104F/1114R

Os reagentes de PCR utilizados estão descritos na tabela 5, no entanto ao longo do processo foram feitos ajustes, consoante o tipo de reacção e o microrganismo em questão.

Tabela 5 – Reagentes de PCR

Tampão de Reacção (10x)	1x
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	2,0mM
BSA (0,5%)	0,05%
dNTP'S (Mix 10mM)	200uM
Primer F	0,5µM
Primer R	0,5µM
Taq (5U/µL)	1 Unidade
UPW	QB

Após crescimento de culturas segundo as normas ISO, os ensaios decorreram das seguintes formas:

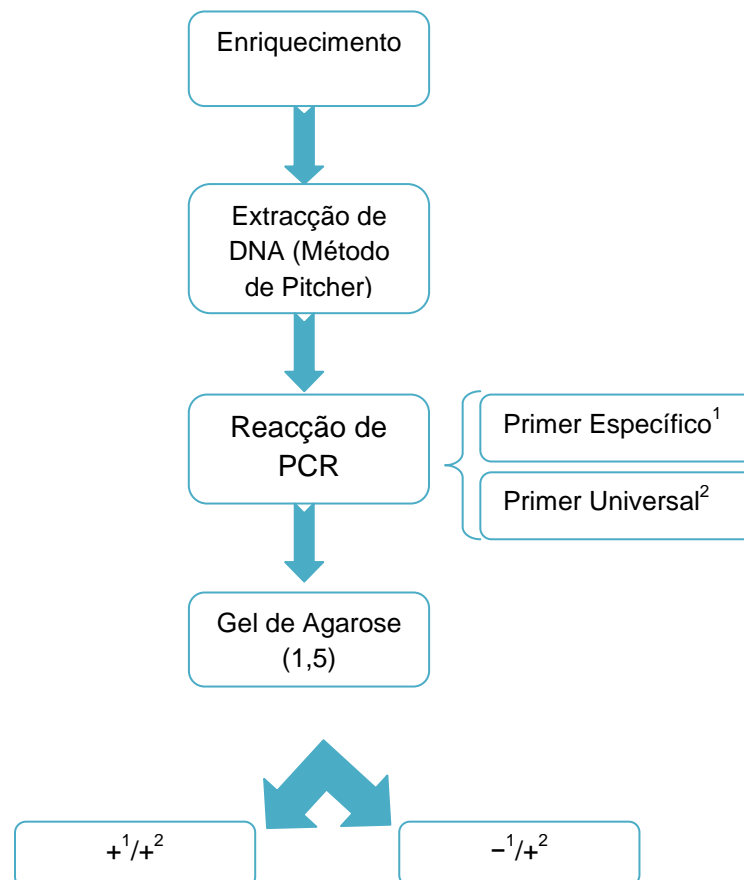
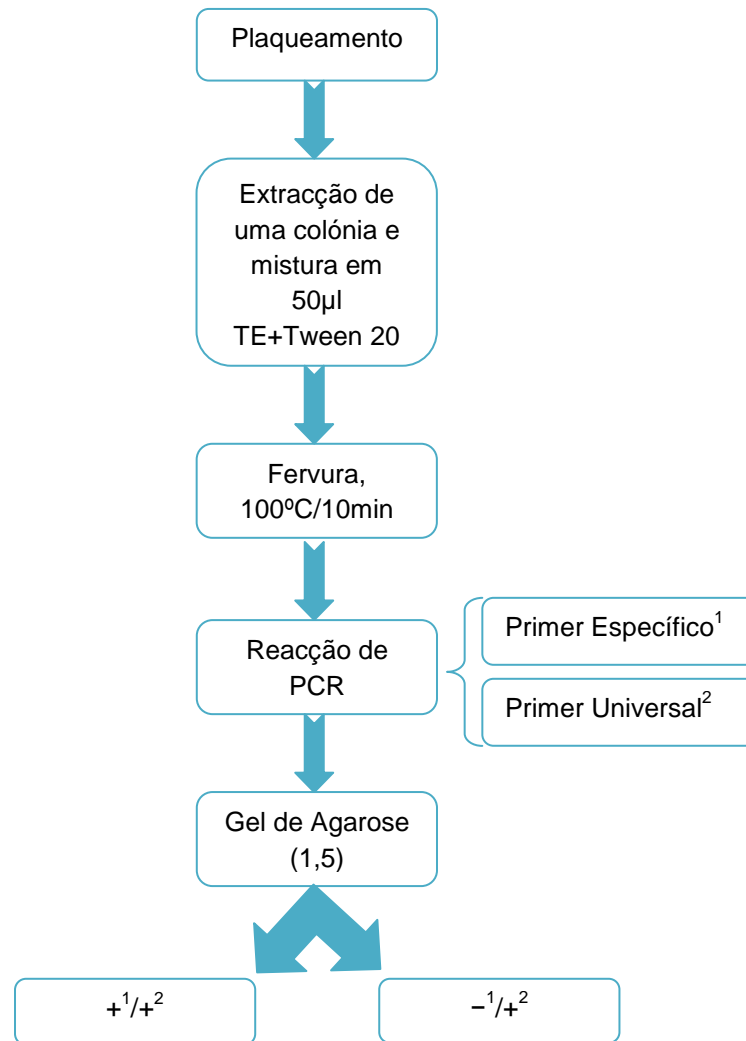


Figura 4- Ensaio de determinação de microrganismos por PCR directamente a partir do enriquecimento, com pares de primers específicos e universais.



**Figura 5- Ensaio de confirmação por PCR após plaqueamento do enriquecimento em meio de cultura apropriado com pares de primers específicos e universais.**

Nas reacções em que o DNA utilizado tinha origem nesta mistura de TE+Tween 20, de forma a ser o mais eficaz possível, o tempo de desnaturação inicial na reacção de PCR foi alterado de 5 para 10 minutos.

Após as reacções a verificação dos resultados era feita por gel de agarose em electroforese.

Há uma preparação prévia de um gel de agarose, normalmente a 1,5% (para 0,5L de TAE, colocar 7,5g de Agarose), com adição de brometo de etídio, EtBr (5µL por 100ml de gel de agarose), que dá fluorescência às amostras quando o gel é revelado sob luz ultravioleta. Depois de colocado num molde, o gel é deixado a polimerizar e só depois colocado dentro da tina de electroforese, que contém tampão TAE. As amostras de reacção, antes de colocadas no gel, são misturadas com loading buffer, uma substância que dá peso e cor às amostras.

Normalmente no primeiro poço é colocado um marcador de pesos moleculares, para se poder ter uma base de comparação em relação ao tamanho dos fragmentos resultantes da reacção. A partir daqui as amostras são colocadas sob uma ordem definida. A tina é ligada a 100 Volts e iniciada a corrida. Esta última só é parada quando os fragmentos estiverem separados uns dos outros de acordo com o pretendido no ensaio. O gel é por fim revelado por acção de luz ultra violeta.

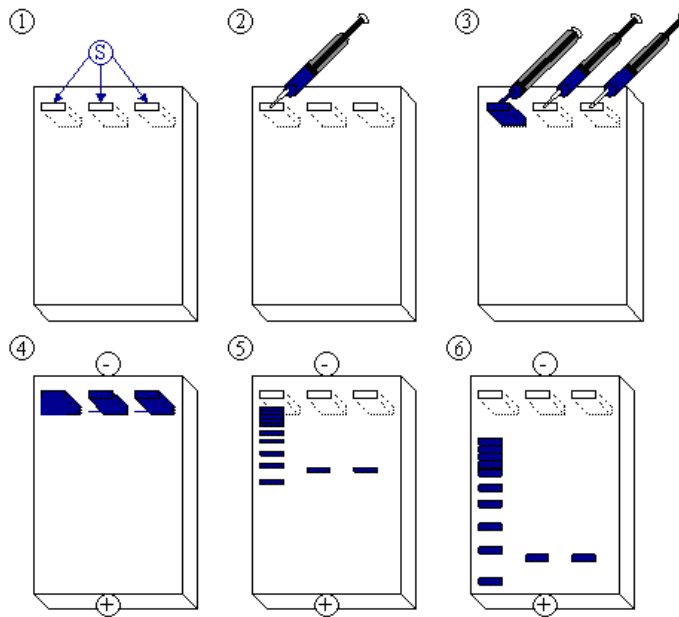


Figura 6- Aplicação de amostras em gel de agarose e sua separação.

## RESULTADOS e DISCUSSÃO

### 1- Detecção de *Campylobacter* sp

Foram realizados 3 ensaios, todos para verificar o nível de especificidade e temperatura óptima de acção do par de primers específico.

#### 1.1- Detecção de *Campylobacter* sp segundo norma ISO ()

Os resultados do primeiro ensaio estão na tabela abaixo, tabela 6, sendo que o sinal mais (+) significa resultado positivo e o sinal menos (-) resultado negativo.

**Tabela 6- Resultados do primeiro ensaio de detecção específica de *Campylobacter* sp, por PCR.**

Amostras	Resultado
<i>Salmonella enteridis</i>	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	-
<i>E. coli</i> O157:H7	-
<i>Campylobacter jejuni/coli</i>	+
<i>Campylobacter jejuni/coli</i>	+
<i>Campylobacter jejuni/coli</i>	+
<i>Campylobacter lari</i>	-
Branco	-

Neste primeiro ensaio observou-se que o par de primers apenas originou amplificação nas espécies *Campylobacter jejuni* e *C. coli*. A espécie *Campylobacter lari* não originou qualquer amplificação o que revela a elevada especificidade deste par de primers.

### 1.2- Determinação de temperatura de annealing do par de primers específico para detecção de *Campylobacter* sp

O segundo ensaio foi do tipo gradiente, em que a temperatura testada variou entre os 55 e os 65°C. Os resultados encontram-se na tabela abaixo, (tabela 7). Ficou determinado que a temperatura óptima seria de 55°C.

Tabela 7- Ensaio de gradiente de *Campylobacter* sp

Amostras	55°C	58°C	61°C	65°C
<i>Campylobacter jejuni/coli</i>	+	+	+	-
<i>Campylobacter jejuni/coli</i>	+	+	-	-
<i>Campylobacter jejuni/coli</i>	+	-	-	-
Branco	-	-	-	-

### 1.3- Verificação da especificidade do par de primers

No 3º e último ensaio realizado, o par de primers foi testado com uma gama de 10 de bactérias pertencentes a diferentes grupos, existindo apenas uma das amostras correspondente a *Campylobacter* sp, com 300pb. A figura mostra os resultados.

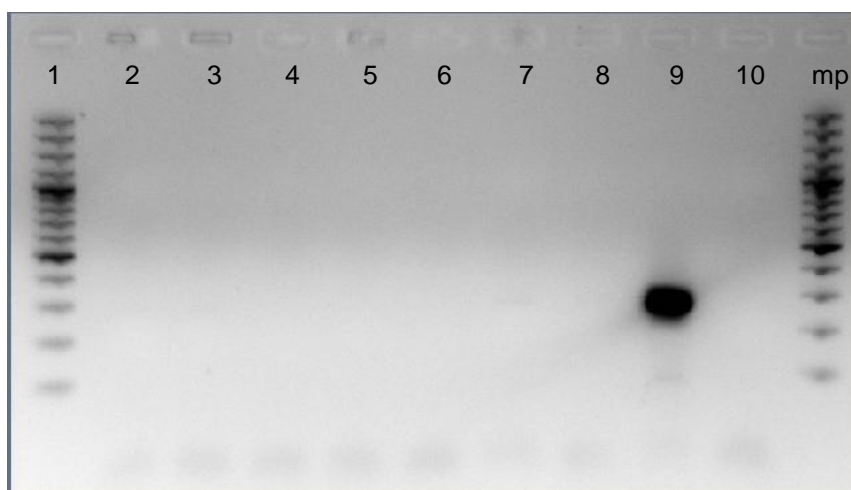


Figura 7 – Ensaio de especificidade do par de primers para *Campylobacter* sp, num conjunto de 19 amostras, em que: 1- *Leuconostoc* sp; 2- *Lactococcus lactis*; 3- *Haemophilus ducreiy*; 4- *Serratia* sp; 5- *Morganella* sp; 6- *Bacillus subtilis*; 7- *Pseudomonas stutzeri*; 8- *Streptococcus pyogenes*; 9- *Bacillus* sp; 10- Branco; mp- Marcador de pesos moleculares

## 2- Detecção de *Bacillus cereus*

Específico para a bactéria *Bacillus cereus*, este par de primers foi testado quanto à sua especificidade temperatura de acção e capacidade de identificação de amostras desconhecidas. Realizaram-se 3 ensaios.

### 2.1- Determinação de temperatura de annealing para detecção de *Bacillus cereus*

No primeiro ensaio foi realizado um teste de gradiente, isto para verificar até que temperatura a acção do par de primers é eficaz. Para isso 4 diferentes amostras foram sujeitas a temperaturas entre os 56 e os 64°C. Ficou definido que a temperatura óptima de acção era de 56°C.

**Tabela 8 - Ensaio de gradiente de *Bacillus cereus***

Amostras	56°C	58°C	60°C	62°C	64°C
<i>Salmonella enteridis</i>	-	-	-	-	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	-	-	-	-	-
<i>E. coli O157:H7</i>	-	-	-	-	-
<i>Bacillus cereus</i>	+	+	-	-	-
Branco	-	-	-	-	-

### 2.2- Verificação da especificidade do par de primers Determinação de temperatura de annealing para detecção de *Bacillus cereus*

No segundo ensaio foi posta à prova a sua especificidade tendo para isso sido utilizados os 19 amostras da tabela w, que se encontra no material e métodos. O gel 2 mostra os resultados.

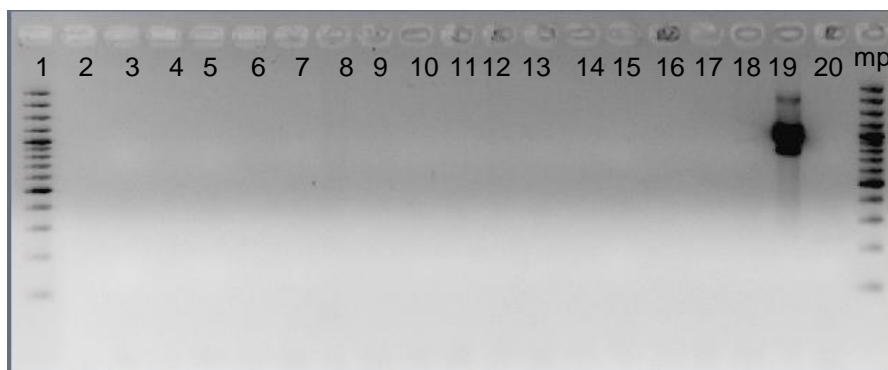


Figura 8- Ensaio de especificidade do par de primers de *Bacillus cereus*, num conjunto de 19 amostras, em que: 1- *Leuconostoc* sp; 2- *Lactococcus lactis*; 3- *Haemophilus ducreiy*; 4- *Serratia* sp; 5- *Morganella* sp; 6- *Bacillus subtilis*; 7- *Pseudomonas stutzeri*; 8- *Streptococcus pyogenes*; 9- *Bacillus* sp; 10- *Chlamydia* sp; 11- *Haemophilus influenza*; 12- *Salmonella* sp; 13- *Listeria monocytogenes*; 14- *Esc. coli* O157:H7; 15- *Vibrio cholerae*; 16- *Vibrio parahaemolyticus*; 17- *Vibrio parahaemolyticus*; 18- *Campylobacter* sp; 19- *Bacillus cereus*; 20- Branco; mp- Marcador de pesos moleculares.

### 2.3- Detecção de *Bacillus cereus* a partir de cultura

No terceiro ensaio uma amostra desconhecida foi sujeita a teste de identificação. Foi usada uma amostra de *Bacillus cereus*, como controlo positivo, para além da amostra desconhecida. Os resultados estão na tabela 9.

Tabela 9- Identificação de amostra por acção de pares de primers específicos de *Bacillus cereus*

Amostras	Resultados
Desconhecida	+
<i>Bacillus cereus</i>	+
Branco	-

### 3- Detecção de *Vibrio parahaemolyticus*

#### 3.1- Determinação de temperatura de annealing para detecção de *Vibrio parahaemolyticus*

Não foi preciso determinar esta temperatura, visto ter sido definida em trabalhos anteriores, nos 62°C.

### 3.2- Verificação da especificidade do par de primers

No primeiro ensaio o par de primers foi testado numa gama de 19 amostras, DNA's de bactérias de diferentes grupos. Foi apenas amplificado o DNA da amostra de *Vibrio parahaemolyticus*, como é possível ver na tabela 10 os resultados.

Amostras	Resultado
<i>Leuconostoc sp</i>	-
<i>Lactococcus lactis</i>	-
<i>Haemophilus ducreiy</i>	-
<i>Serratia sp</i>	-
<i>Morganella sp</i>	-
<i>Mycoplasma sp</i>	-
<i>Bacillus subtilis</i>	-
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	-
<i>Streptococcus pyogenes</i>	-
<i>Bacillus cereus</i>	-
<i>Chlamydia sp</i>	-
<i>Salmonella enteridis</i>	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	-
<i>E. coli O157:H7</i>	-
<i>Vibrio cholerae</i>	-
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	+
<i>Campylobacter jejuni/coli</i>	-
<i>Bacillus cereus</i>	-
Branco	-

### 3.2- Identificação de amostras desconhecidas

No segundo ensaio foram testadas 2 amostras desconhecidas. Um DNA de *Vibrio parahaemolyticus* foi incluído como controlo positivo, tabela 11.

**Tabela 11- Identificação de amostras por acção do par de primers específico para *Vibrio parahaemolyticus*.**

Amostras	Resultados
Desconhecida	-
Desconhecida	-
<i>Vibrio parahaemoliticus</i>	+
Branco	-

#### 4- Detecção de *Vibrio cholerae*

Este par de primers foi testado em 4 ensaios.

##### 4.1- Determinação de temperatura de annealing para detecção de *Vibrio cholerae*

Não foi preciso determinar esta temperatura, visto ter sido definida em trabalhos anteriores, nos 62°C.

##### 4.2- Verificação da especificidade do par de primers

No primeiro ensaio foram utilizadas 19 amostras diferentes, sendo só uma delas *Vibrio cholerae*, gel 3.



Figura 9- Ensaio de especificidade do par de primers de *Vibrio cholerae*, num conjunto de 19 amostras, em que: 1- *Leuconostoc sp*; 2- *Lactococcus lactis*; 3- *Haemophylus ducreyi*; 4- *Serratia sp*; 5- *Morganella sp*; 6- *Bacillus subtilis*; 7- *Pseudomonas stutzeri*; 8- *Streptococcus pyogenes*; 9- *Bacillus sp*; 10- *Chlamydia sp*; 11- *Haemophylus influenza*; 12- *Haemophylus sp*; 13- *Salmonella sp*; 14- *Listeria monocytogenes*; 15- *Esc. coli O157:H7*; 16- *Vibrio cholerae*; 17- *Vibrio parahaemolitycus*; 18- *Campylobacter sp*; 19- Branco; mp- Marcador de pesos moleculares.

##### 4.3- Identificação de amostras desconhecidas

No segundo ensaio foram submetidas a identificação 3 amostras cegas na presença de um controlo positivo, tabela 12.

Tabela 12- Identificação de amostras por acção do par de primers de *Vibrio cholerae*

Amostras	Resultados
<i>Vibrio cholerae</i>	+
Desconhecida	-
Desconhecida	-
Desconhecida	+
Branco	-

Como se pode verificar pelos resultados, apenas a terceira amostra cega pertencia a esta espécie de microrganismos.

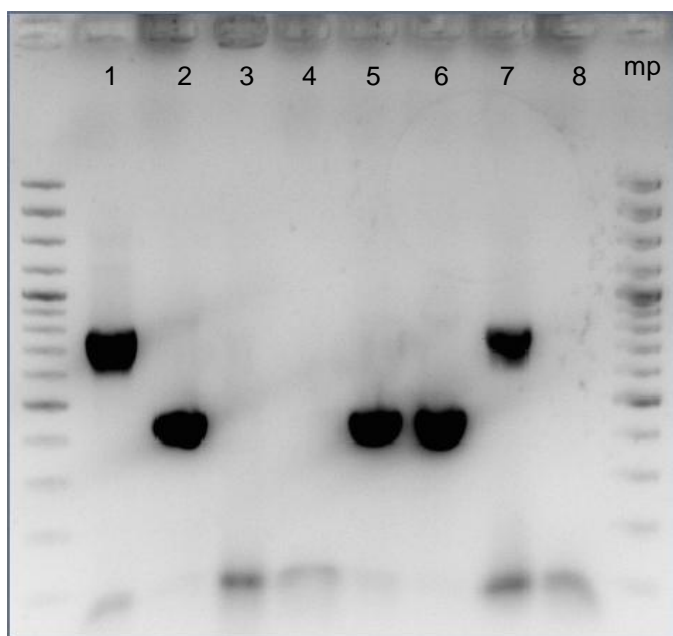
No terceiro ensaio mais uma vez tratou da identificação de duas amostras cegas, as mesmas utilizadas no terceiro ensaio para o par de primers de detecção de *Vibrio cholerae*, estando os resultados da identificação na tabela 13.

**Tabela 13- Identificação de amostras por acção do par de primers de *Vibrio cholerae***

Amostras	Resultados
Desconhecida	+
Desconhecida	+
<i>Vibrio cholerae</i>	+
Branco	-

#### 4.4- Identificação de amostras desconhecidas a partir da conjugação dos pares de primers de *Vibrio parahaemolyticus* e *cholerae*

No último ensaio realizou-se um duplex, em que se misturaram os dois pares de primers de detecção de *Vibrio*, (*parahaemolyticus* e *cholerae*), para identificação de duas amostras desconhecidas. Os resultados encontram-se na figura 10.



**Figura 10- Duplex entre TlhF/TlhR e ToxF/ToxR em que: 1- *Vibrio cholerae*; 2- Amostra desconhecida; 3- Amostra desconhecida; 4- Branco; 5- *Vibrio parahaemolyticus*; 6- Amostra desconhecida; 7- Amostra desconhecida; 8- Branco**

### 5- Deteccção de *Listeria monocytogenes*

Realizaram-se 4 ensaios.

#### 5.1- Determinação de temperatura de annealing para deteção de *Listeria monocytogenes*

Não foi preciso determinar esta temperatura, visto ter sido definida em trabalhos anteriores, nos 62°C.

#### 5.2- Verificação da especificidade do par de primers

No primeiro foi posto à prova um total de 19 amostras bacterianas, pertencentes a diferentes grupos, figura 11.

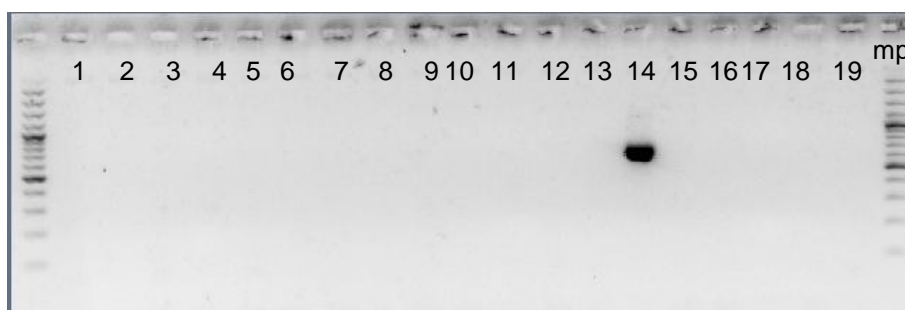


Figura 11- Ensaio de especificidade do par de primers de *Listeria monocytogenes*, num conjunto de 19 amostras, em que: 1- *Leuconostoc sp*; 2- *Lactococcus lactis*; 3- *Haemophylus ducreiy*; 4- *Serratia sp*; 5- *Morganella sp*; 6- *Bacillus subtilis*; 7- *Pseudomonas stutzeri*; 8- *Streptococcus pyogenes*; 9- *Bacillus sp*; 10- *Chlamydia sp*; 11- *Haemophylus influenza*; 12- *Haemophylus sp*; 13- *Salmonella sp*; 14- *Listeria monocytogenes*; 15- *Esc. coli* O157:H7; 16- *Vibrio vulnificus*; 17- *Vibrio parahaemolyticus*; 18- *Vibrio cholerae*; 19- *Campylobacter sp*; 20- *Bacillus cereus*; 21- Branco; mp- Marcador de pesos moleculares.

#### 5.3- Identificação de amostras desconhecidas

No segundo ensaio o par de primers foi testado em 3 amostras cegas, tendo sido obtida amplificação em 2 das amostras, tabela 14.

Tabela 14- Identificação de amostras por acção do par de primers de *Listeria monocytogenes*

Amostras	Resultados
<i>Listeria monocytogenes</i>	+
Desconhecida	-
Desconhecida	+
Desconhecida	+
Branco	-

No terceiro ensaio procedeu-se à identificação de mais duas amostras cegas. Os resultados estão na tabela 15:

**Tabela 15- Identificação de amostras por acção do par de primers de *Listeria monocytogenes***

Amostras	Resultados
Desconhecida	-
Desconhecida	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	+
Branco	-

Para estas duas amostras alimentares, que em cultura possuíam um comportamento fenotípico semelhante a este microrganismo, após amplificação por PCR verificou-se que o padrão de bandas era diferente do normal do verificado nos ensaios anteriores. Decidiu-se que estes produtos iriam ser purificados e sequenciados, para verificar que realmente não se tratavam desta bactéria e após sequenciação foi possível ter conhecimento que as amostras não correspondiam a esta espécie bacteriana.

#### 5.4- Identificação de *Listeria monocytogenes* de acordo com norma e por DNA de cultura

No quarto ensaio utilizaram-se 5 amostras, em que duas delas continham células de *Listeria monocytogenes* retirado directamente de cultura e, misturado em 50µL de TE+Tween 20 e fervido durante 10 minutos a 100°C. Os resultados estão na tabela 16.

**Tabela 16- Especificidade do par de primers de *Listeria monocytogenes***

Amostras	Resultados
<i>Esc. coli</i> O157:H7	-
<i>Salmonella enteridis</i>	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	+
DNA de cultura	+
DNA de Cultura	+
Branco	-

## 6- Detecção de *Salmonella* sp

Realizaram-se 3 ensaios.

### 6.1- Determinação de temperatura de annealing para *Salmonella* sp

Não foi preciso determinar esta temperatura, visto ter sido definida em trabalhos anteriores, nos 62°C.

### 6.2- Verificação da especificidade do par de primers

No primeiro o par de primers foi testado em 19 amostras bacterianas referentes a diferentes grupos, figura 12.

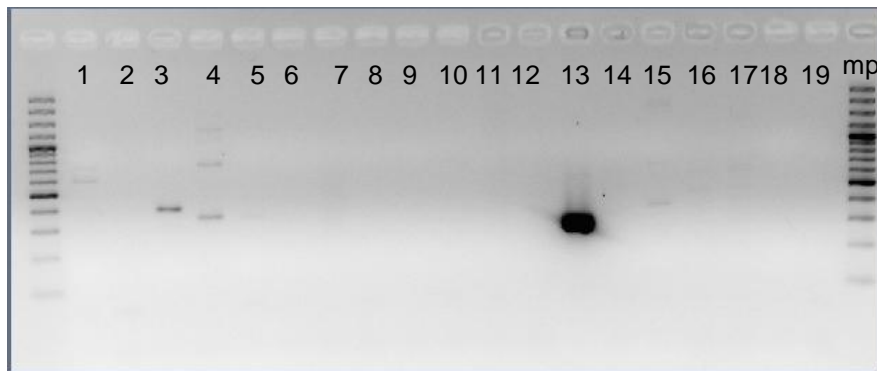


Figura 12- Ensaio de especificidade do par de primers de *Salmonella* sp, num conjunto de 19 amostras, em que: 1- *Leuconostoc* sp; 2- *Lactococcus lactis*; 3- *Haemophylus ducreiy*; 4- *Serratia* sp; 5- *Morganella* sp; 6- *Bacillus subtilis*; 7- *Pseudomonas stutzeri*; 8- *Streptococcus pyogenes*; 9- *Bacillus* sp; 10- *Chlamydia* sp; 11- *Haemophylus influenza*; 12- *Haemophylus* sp; 13- *Salmonella* sp; 14- *Listeria monocytogenes*; 15- *Esc. coli* O157:H7; 16- *Vibrio vulnificus*; 17- *Vibrio parahaemolyticus*; 18- *Vibrio cholerae*; 19- *Campylobacter* sp; 20- *Bacillus cereus*; 21- Branco; mp- Marcador de pesos moleculares.

### 6.3- Identificação de amostras desconhecidas

No segundo ensaio foram testadas duas amostras cegas, tabela 17. O padrão de bandas referente à amplificação da amostra cega era diferente do padrão da amostra do controlo positivo. Esta amostra desconhecida foi purificada e, mais tarde, sequenciada, mostrando que não se tratava de *Salmonella* sp.

Tabela 17- Identificação de amostras por acção do par de primers de *Salmonella sp*

Amostras	Resultados
Desconhecida	-
Desconhecida	+
<i>Salmonella sp</i>	+
Branco	-

#### 6.4- Identificação de amostras a partir da conjugação dos pares de primers de *Salmonella sp* e *Listeria monocytogenes*

O último ensaio foi um duplex entre o par de primers de *Salmonella sp* e *Listeria monocytogenes*. O conjunto de amostras era composto por DNA concentrado obtido por crescimento destes dois microrganismos consoante as normas ISO, DNA retirado directamente de cultura fervida com TE+Tween 20 e, ainda, uma mistura de 2 culturas (*Salmonella sp*, *Listeria monocytogenes*), também misturada com TE+Tween 20 e fervida.

Os resultados da tabela 18 mostram que existe amplificação perfeita de produto em todas as amostras excepto na referente à mistura de DNA's, em que só é visível a banda de *Salmonella sp*, não tendo ocorrido amplificação de *Listeria monocytogenes*. Este facto poderá dever-se ao tamanho dos fragmentos de PCR obtidos para cada espécie. O fragmento específico de *Salmonella sp*, por ser menor, é preferencialmente amplificado.

Tabela 18- Duplex com pares de primers de *Salmonella sp* e *Listeria monocytogenes*

Amostras	Resultados
<i>Salmonella sp</i>	+
<i>Listeria monocytogenes</i>	+
<i>Salmonella sp</i> de cultura	+
<i>Listeria monocytogenes</i> de cultura	+
Mix 3 DNA's	+/-
Branco	-

## 7- Deteccção de *Escherichia coli* O157:H7

Foram testados 4 pares de Primers diferentes, relativos à bactéria *Esc. coli*, O157RFbE\_F/O157RFbE\_R; Stx1F/Stx1R; EaeF/EaeR e H7FlicF/H7flicR.

### 7.1- Par de primers O157RFbE\_F/O157RFbE\_R

#### 7.1.1- Determinação de temperatura de annealing

Os ensaios de gradiente, que serviram para determinar até que temperaturas o par de primers actua. Foi feito um primeiro gradiente entre 62 e 66°C. No segundo gradiente o intervalo de temperaturas situou-se entre os 66 e os 72°C, a tabela 19 resume os resultados dos dois ensaios.

**Tabela 19- Gradiente do par de primers de *Esc. coli* O157:H7**

Amostras	62°C	64°C	66°C	68°C	70°C	72°C
<i>Esc. coli</i> O157:H7	+	+	+	+	-	-
Branco	-	-	-	-	-	-

#### 7.1.2- Verificação da especificidade do par de primers

No primeiro ensaio o par de primers foi testado num universo de 19 diferentes amostras bacterianas, figura 13.



Figura 13- Ensaio de especificidade do par de primers de *Esc. coli* O157:H7, num conjunto de 19 amostras, em que: 1- *Leuconostoc sp*; 2- *Lactococcus lactis*; 3- *Haemophylus ducreiy*; 4- *Serratia sp*; 5- *Morganella sp*; 6- *Bacillus subtilis*; 7- *Pseudomonas stutzeri*; 8- *Streptococcus pyogenes*; 9- *Bacillus sp*; 10- *Chlamydia sp*; 11- *Haemophylus influenza*; 12- *Haemophylus sp*; 13- *Salmonella sp*; 14- *Listeria monocytogenes*; 15- *Esc. coli* O157:H7; 16- *Vibrio vulnificus*; 17- *Vibrio parahaemolitycus*; 18- *Vibrio cholerae*; 19- *Campylobacter sp*; 20- *Bacillus cereus*; 21- Branco; mp- Marcador de pesos moleculares.

7.1.3- Identificação de amostras desconhecidas

No segundo ensaio o par de primers foi testado numa amostra cega, tabela 20.

**Tabela 20- Identificação de amostras por acção do par de primers de *Esc. coli* O157:H7**

Amostras	Resultados
Desconhecida	-
<i>Esc. coli</i> O157:H7	+
Branco	-

7.1.4- Verificação da presença do factor de virulência O157:H7

No terceiro ensaio o par de primers foi utilizado com o intuito de identificar a presença de *Esc. coli* O157:H7 em 12 amostras de origem alimentar. A tabela 21 mostra os resultados.

**Tabela 21- Detecção de *Esc. coli* O157:H7**

Amostras	Resultado
<i>Esc. coli</i> O157:H7	+
Alimentar 1	-
Alimentar 2	-
Alimentar 3	-
Alimentar 4	-
Alimentar 6	-
Alimentar 7	-
R.J. VTI A	-
R.J. VTI B	-
R.J. VTI C	-
ETEC AMAR R.J.	-
IMUNOL R.J.	-
Branco	-

No quarto ensaio foram testadas duas amostras provenientes de colónias. A primeira amostra apenas continha *Esc. coli* O157:H7 e a segunda amostra continha uma mistura de 3 DNA's, (*Salmonella* sp, *Esc. coli* O157:H7 e *Listeria monocytogenes*), tabela 22.

Tabela 22- Detecção de *Esc. coli* O157:H7 em concentrado de DNA Vs Cultura

Amostras	Resultados
<i>Esc. coli</i> O157:H7	+
<i>Esc. coli</i> O157:H7 cultura	+
Mix 3 DNA	-
Branco	-

## 7.2- Par de primers Stx1F/Stx1R

### 7.2.1- Determinação de temperatura de annealing

O segundo e terceiro ensaios foram do tipo gradiente. O par de primers foi primeiro testado entre 62 e 66°C e depois entre 66 e 72°C, a tabela 23 sumariza os resultados.

Tabela 23- Gradiente do par de primers referente ao factor de virulência Stx1

Amostras	62°C	64°C	66°C	68°C	70°C	72°C
<i>Esc. coli</i> O157:H7	+	+	+	+	+	+
Branco	-	-	-	-	-	-

### 7.2.2- Verificação da presença do factor de virulência Stx1

Para o segundo par de primers efectuaram-se 3 testes. No primeiro, a especificidade do par de primers foi testada em 12 amostras alimentares, tabela 24.

Tabela 24- Detecção da presença do factor de virulência Stx1

Amostras	Resultado
<i>Esc. coli</i> O157:H7	+
Alimentar 1	+
Alimentar 2	-
Alimentar 3	-
Alimentar 4	-
Alimentar 6	-
Alimentar 7	-
R.J. VTI A	-
R.J. VTI B	-
R.J. VTI C	-
ETEC AMAR R.J.	-

Am IMUNOL R.J.	-
Branco	-

### 7.3- Par de primers EaeF/EaeR

#### 7.3.1- Determinação de temperatura de annealing

No segundo ensaio, foi feito um gradiente entre as temperaturas 62 e 66°C, tabela 25.

**Tabela 25- Gradiente referente ao par de primers do factor de virulência Eae**

Amostras	62°C	64°C	66°C
<i>Esc. coli</i> O157:H7	+	+	+
Branco	-	-	-

#### 7.3.2- Verificação da presença do factor de virulência Eae

No primeiro ensaio o par de primers foi testado com 12 amostras alimentares. Só uma amostra revelou resultados positivos, tal como se pode verificar na tabela 26.

**Tabela 26- Detecção da presença do factor de virulência Eae**

Amostras	Resultado
Am <i>E. coli</i> O157:H7	+
Am Alimentar 1	-
Am Alimentar 2	-
Am Alimentar 3	-
Am Alimentar 4	-
Am Alimentar 6	-
Am Alimentar 7	-
Am R.J. VTI A	-
Am R.J. VTI B	-
Am R.J. VTI C	-
Am ETEC AMAR R.J.	-
Am IMUNOL R.J.	-
Branco	-

#### 7.4- Par de primers H7flicF/H7flicR

##### 7.4.1- Determinação de temperatura de annealing

O segundo ensaio, tipo gradiente, foi realizado entre as temperaturas 62 e 66°C. Na tabela 27 pode-se verificar que o par de primers actua até aos 66°C.

**Tabela 27- Gradiente referente ao par de primers do factor de virulência H7flic**

Amostras	62°C	64°C	66°C
Am <i>E. coli</i> O157:H7	+	+	+
Branco	-	-	-

##### 7.4.2- Verificação da presença do factor de virulência H7flic

Para o último par de primers foram realizados 3 ensaios, o primeiro com as 12 amostras alimentares. A tabela 28 mostra que apenas uma estirpe apresenta este factor de virulência.

**Tabela 28- Detecção da presença do factor de virulência H7flic**

Amostras	Resultado
<i>Esc. coli</i> O157:H7	+
Alimentar 1	-
Alimentar 2	-
Alimentar 3	-
Alimentar 4	-
Alimentar 6	-
Alimentar 7	-
R.J. VTI A	-
R.J. VTI B	-
R.J. VTI C	-
ETEC AMAR R.J.	-
IMUNOL R.J.	-
Branco	-

### 7.4.3- Duplex com H7flicF/H7flicR e EaeF/EaeR

O terceiro ensaio envolveu também o par de primers EaeF/EaeR. Foi então realizado um duplex, no conjunto de 12 amostras de origem alimentar. Daqui resultaram duas bandas distintas numa amostra, a de *Esc. coli* O157:H7, mostrando que mais nenhuma estirpe possui um ou os dois factores de virulência, figura 14.

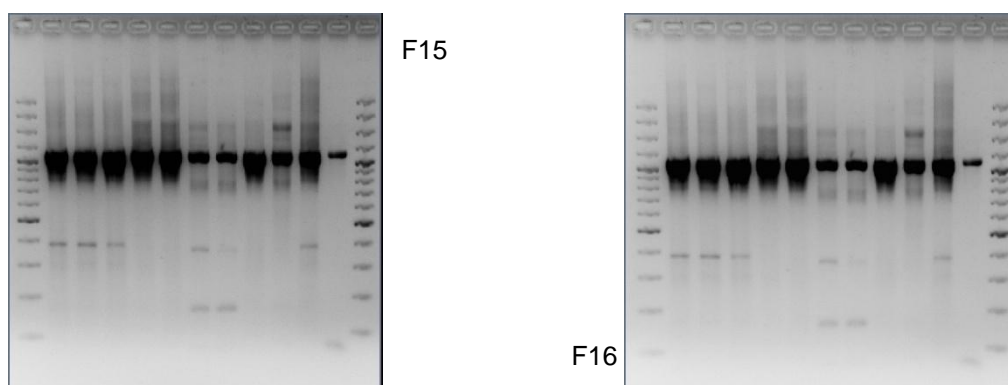


**Figura 14- Duplex com os pares de primers H7flicF/H7flicR e EaeF/EaeR, em que: 1- *Esc. coli* O157:H7; 2- Am Alimentar 1; 3- Am Alimentar 2; 4- Am Alimentar 3; 5- Am Alimentar 4; 6- Am Alimentar 6; 7- Am Alimentar 7; 8- RJ VTIA; 9- RJ VTIB; 10- RJ VTIC; 11- ETEC AMAR RJ; 12- IMUNOL RJ; 13- Branco.**

### 8- Pares de primers Universais

Foram realizados 3 ensaios com diferentes pares de primers universais, para perceber qual seria o par mais compatível e que melhor se adequava ao estudo. Este tipo de primers, normalmente, não é específico no que respeita a DNA, vai diferir apenas nos tamanhos de bandas que conseguem amplificar.

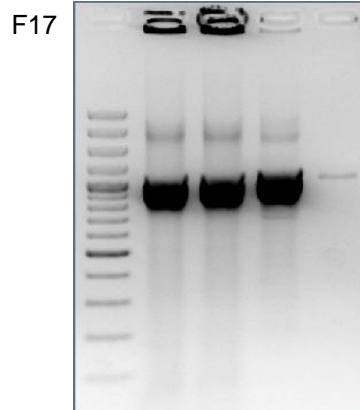
As figuras abaixo mostram os resultados obtidos, sendo notório que o conjunto 104F/1114R é aquele que melhor se aplica, pois é aquele que leva à formação de bandas únicas, bem definidas e sem formação de outras bandas indefinidas.



**Figura 15- Padrão de bandas formado pelo par de primers Pa/907R**

**Figura 16- Padrão de bandas formado pelo par de primers Pa/1114R**

**Figura 17- Padrão de bandas formado pelo par de primers 104F/1114R**



### 9- Ensaio Multiplex

Realizaram-se, ao todo, 8 ensaios multiplex, com diferentes combinações de pares de primers.

#### 9.1- Primers Universais e Primers Específicos

Nos primeiros 3 ensaios conjugou-se o par de primers universal 104F/1114R com pares de primers específicos de *Salmonella sp*, *Listeria monocytogenes* e *Esc. coli* O157:H7

Na combinação 104F/1114R e O157RFbE\_F/O157RFbE\_R foram testadas 5 amostras. As primeiras 3 referentes a DNA's concentrados de *Esc. coli* O157:H7, *Salmonella sp* e *Listeria monocytogenes*, respectivamente. As outras amostras continham DNA de *Esc. coli* O157:H7, retirado directamente de colónia, tabela 29.

**Tabela 29- Duplex 104F/1114R e O157RFbE\_F/O157RFbE\_R**

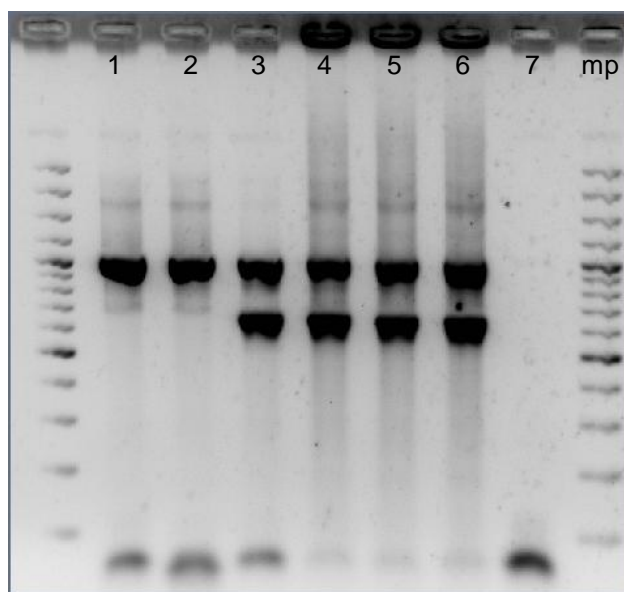
Amostras	Resultados
Am <i>E. coli</i> O157:H7	+/+
Am <i>Salmonella enteridis</i>	+
Am <i>Listeria monocytogenes</i>	+
Am colónia <i>E. coli</i> O157:H7	+/+
Am colónia <i>E. coli</i> O157:H7	+/+
Branco	-

Na primeira amostra para além da banda relativa ao par de primers universal, também era visível a banda referente ao par de primers específico. Nas amostras de *Salmonella sp* e *Listeria monocytogenes* apenas surgiu a banda específica do par de

primers universal. Nas amostras referentes a *Esc. coli* O157:H7 de cultura, apenas era visível a banda referente ao par de primers específico.

Seguiu-se a combinação entre o par de primers universal do ensaio anterior com o par de primers específico Lmon218F/Lmon857R.

As amostras utilizadas, 6 ao todo, das quais faziam parte os concentrados de DNA de *Esc. coli* O157:H7, *Salmonella sp* e *Listeria monocytogenes* e três amostras de DNA retirado directamente de cultura de *Listeria monocytogenes*, os resultados estão na figura 18 a seguir:



**Figura 18- Conjugação de 104F/1114R e Lmon218F/Lmon857R, em que: 1- *E. coli* O157:H7; 2- *Salmonella sp*; 3- *Listeria monocytogenes*; 4; 5 e 6- *Listeria monocytogenes* de cultura; 7- Branco**

Em todas as amostras, sem excepção, foi registada a banda relativa ao par de primers universal. Para além desta banda, nas amostras de *Listeria monocytogenes*, tanto no concentrado de DNA, como em amostras de cultura, registou-se também a banda referente ao par de primers específico.

Por último foi combinado o par de primers universal, o mesmo utilizado nos ensaios anteriores, com o par de primers específico Sal1F/Sal1R.

Também aqui foram utilizadas 5 amostras, as 3 primeiras relativas aos concentrados de, *E. coli* O157:H7, *Salmonella sp* e *Listeria monocytogenes*. As 2 outras amostras, obtidas directamente de cultura, eram referentes a *Salmonella sp*. A figura 19 mostra os resultados.

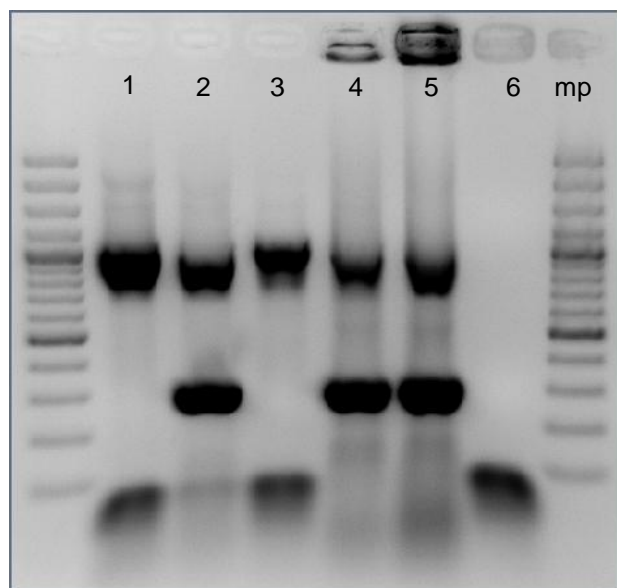


Figura 19- Conjugação de 104F/1114R e Lmon218F/Lmon857R, em que: 1- *Esc. coli* O157:H7; 2- *Salmonella sp*; 3- *Listeria monocytogenes*; 4 e 5- *Listeria monocytogenes* de cultura; 6- Branco

### 9.2- Conjugação de pares de primers específicos

Em todos os 5 ensaios forma conjugados 3 pares de primers específicos de *Salmonella sp*, *Listeria monocytogenes* e *Esc. coli* O157:H7.

No primeiro ensaio foram usadas 6 amostras, 5 delas conhecidas e uma cega. Ao mesmo tempo, foi também realizado um gradiente entre as temperaturas de 62°C e 68°C. A tabela 30 resume os resultados.

Tabela 30- Gradiente multiplex de primers específicos

Amostras	62°C	64°C	66°C	68°C
<i>Salmonella sp</i>	+	+	+	+
<i>Listeria monocytogenes</i>	+	+	-	-
<i>Vibrio cholerae</i>	-	-	-	-
<i>Bacillus sp</i>	-	-	-	-
<i>Haemophylus influenza</i>	-	-	-	-
Desconhecida	+/+	+/+	+/+	+
Branco	-	-	-	-

Verificou-se que os 3 pares de primers em conjunto funcionam até 64°C, o par de primers de *Listeria monocytogenes* deixa de funcionar a partir desta temperatura, o que não acontece com os outros 2, que funcionam até 68°C.

Também se verificou que apenas foram amplificados os DNA das amostras específicas para os pares de primers. Foi detectado neste ensaio que a amostra cega possuía DNA de *Salmonella* sp e de *E. coli* O157:H7, isto pela formação de duas bandas no poço relativo à amostra.

No segundo ensaio misturaram-se 3 DNA's, *Salmonella* sp, *Listeria monocytogenes* e *Esc. coli* O157:H7, com uma concentração inicial de 2ng. Desta mistura foram feitas 4 diluições, todas de 1:10, para verificar até que concentração ocorria amplificação. Como resultado verificou-se os 3 DNA's eram amplificados até à concentração de 200pg, figura 20.

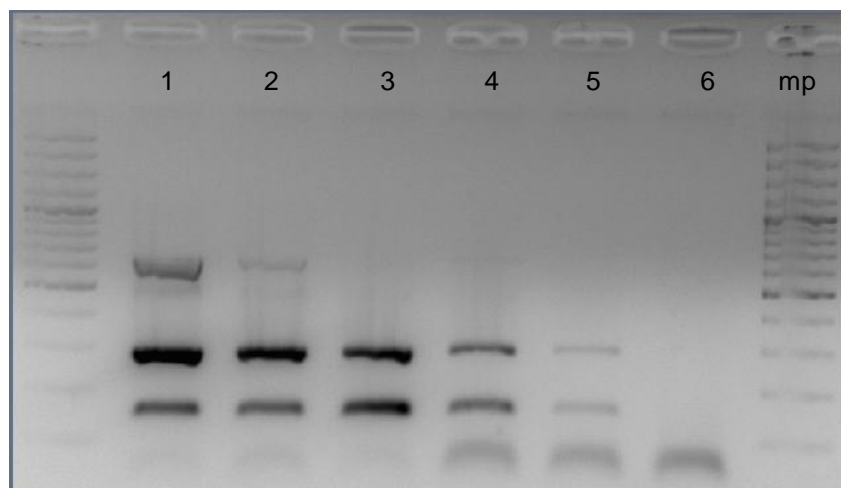


Figura 20- Capacidade de amplificação de amostras a diferentes concentrações, em que:

- 1- Mistura DNA *Salmonella* sp, *Listeria monocytogenes* e *Esc. coli* O157:H7 a 2ng;
- 2- Mistura DNA *Salmonella* sp, *Listeria monocytogenes* e *Esc. coli* O157:H7 a 200pg;
- 3- Mistura DNA *Salmonella* sp, *Listeria monocytogenes* e *Esc. coli* O157:H7 a 20pg;
- 4- Mistura DNA *Salmonella* sp, *Listeria monocytogenes* e *Esc. coli* O157:H7 a 2pg;
- 5- Mistura DNA *Salmonella* sp, *Listeria monocytogenes* e *Esc. coli* O157:H7 a 0,2pg;
- 6- Branco

No terceiro ensaio foram testadas 6 amostras cegas com 3 controlos positivos. Também foi colocada uma amostra que continha uma mistura dos 3 DNA's dos controlos positivos, tabela 31.

**Tabela 31- Identificação de amostras por acção dos pares de primers de *Salmonella sp*, *Listeria monocytogenes* e *Esc. coli* O157:H7**

Amostras	Resultados
<i>Salmonella sp</i>	+
Desconhecida	-
Desconhecida	-
Branco	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	+
Desconhecida	+
Desconhecida	-
Branco	-
<i>Esc. coli</i> O157:H7	+
Desconhecida	+
Desconhecida	-
Branco	-

No quarto foi comparada a capacidade de amplificação de concentrados de DNA com uma mistura de DNA's retirada directamente de cultura, tabela 32.

**Tabela 32- Comparação de capacidade de amplificação de amostras concentradas e de cultura**

Amostras	Resultados
<i>Esc. coli</i> O157:H7	+
<i>Salmonella sp</i>	+
<i>Listeria monocytogenes</i>	+
Cultura <i>E. coli</i> O157:H7	+/+
Cultura <i>Salmonella sp</i>	+/+
Cultura <i>Listeria monocytogenes</i>	+/+
Branco	-

No quinto ensaio voltou a tentar-se a experiência do quarto ensaio, com a diferença de que foi feita uma mistura dos 3 concentrados de DNA numa amostra e, além da mistura dos DNA de cultura, adicionaram-se 3 amostras isoladas de *Salmonella enteridis*, *Listeria monocytogenes* e *E. coli* O157:H7, com origem em cultura, tabela 33.

Tabela 33- Comparação de capacidade de amplificação de amostras concentradas e de cultura

Amostras	Resultados
<i>Esc. coli</i> O157:H7	+
<i>Salmonella sp</i>	+
<i>Listeria monocytogenes</i>	+
Mix 3 DNA Concentrados	+/+/+
Cultura <i>Esc. coli</i> O157:H7	+
Cultura <i>Salmonella sp</i>	+
Cultura <i>Listeria monocytogenes</i>	+
Mix 3 DNA Cultura	+/+
Branco	-

Tal como nos ensaios anteriores, todas as amostras de concentrados foram perfeitamente amplificadas, mesmo aquela em que se encontravam os 3 DNA's misturados. Também nas amostras isoladas de cultura houve produtos de amplificação, com excepção da amostra com 3 DNA's misturados, em que só o DNA de *Esc. coli* O157:H7 e *Salmonella sp* foram amplificados.

No sexto ensaio fez-se a mesma comparação dos ensaios anteriores, com a diferença de que, em vez de ser feita uma mistura dos DNA's com origem em cultura, estes eram testados isoladamente. Foi então verificado que, quer para os concentrados de DNA, quer para os de origem em cultura, houve uma amplificação perfeita, figura 21.

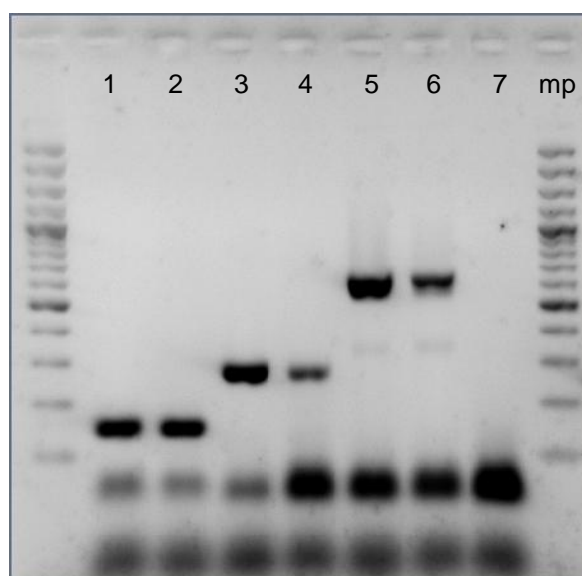


Figura 21- Comparação de detecção a partir de DNA concentrado e a partir de DNA de cultura, em que: 1- DNA *Esc. coli* O157:H7 concentrado; 2- DNA *Esc. coli* O157:H7 cultura; 3- DNA *Salmonella sp* concentrado; 4- DNA *Salmonella sp* cultura; 5- DNA *Listeria monocytogenes* concentrado; 6- DNA *Listeria monocytogenes* cultura; 7- Branco

## CONCLUSÃO

As primeiras provas de detecção de organismos patogêneos alimentares foram feitas há cerca de 20 anos havendo um risco cada vez maior de disseminação destes organismos. O controlo da qualidade microbiana é um programa cada vez mais aplicado em toda a cadeia de produção alimentar, de forma a minimizar o risco de infecção do consumidor <sup>(9)</sup>.

Os métodos de detecção incluem crescimento de microrganismos em meio específico, designando-se este processo por enriquecimento. Segue-se o isolamento de estirpes e identificação destas, por métodos imunológicos e serológicos definidos pela organização ISO <sup>(11)</sup>.

Acontece que estes métodos, supostamente fiáveis e eficientes, requerem um grande período de tempo até à obtenção de resultados, variando este período entre 6 dias a algumas semanas, pois dependem do microrganismo em questão. Para além deste aspecto as propriedades fenotípicas de identificação de bactérias podem nem sempre ser expressas e, mesmo quando o são, a sua classificação e interpretação podem ser complicadas. A estas desvantagens junta-se a não detecção de células viáveis não cultiváveis, como pode acontecer com *Campylobacter* sp <sup>(9)</sup>.

Por sua vez, os ensaios de PCR, que só começaram a ser realizados há 10 anos, deram sinais positivos nos resultados obtidos.

É uma técnica que possui velocidade, bom limite de detecção, selectividade, especificidade, sensibilidade e potencial de automatização.

No entanto, e apesar desta panóplia de qualidades, este novo método a nível tecnológico, tem um alto custo de investimento na sua implementação e a falta de instruções e regulamentações standards aprovadas, leva a que os laboratórios fiquem hesitantes quanto à sua utilização <sup>(9)</sup>.

Este estudo pretende mostrar como é feita a identificação dos mais importantes microrganismos contaminantes alimentares a partir da utilização de pares de primers específicos. Estes representam sequências de DNA únicas e próprias de cada organismo. Assim, aqueles que não apresentarem essa região em particular, não poderão originar produtos de PCR.

A detecção directa e, possivelmente automática, de bactérias alimentares individualmente foi atingida tanto a partir de concentrados de DNA, como a partir de DNA de cultura.

Em todos os ensaios realizados com DNA concentrado foram atingidos os parâmetros acima referidos.

Todos os pares de primers utilizados mostraram ter um nível de especificidade bastante elevado, mesmo quando postas à prova num universo de 19 amostras de bactérias pertencentes a diferentes grupos. Além deste parâmetro ficou também determinado quais as temperaturas de acção óptimas dos pares de primers específicos, nas quais não eram registadas quaisquer bandas inespecíficas ou falsos positivos.

Quisemos no entanto ir ainda mais longe, demonstrando que a detecção directa de bactérias alimentares a partir das amostras, ou seja, DNA de cultura, também pode ser feita com o mesmo grau de precisão.

Nos ensaios com *Bacillus cereus* e *Vibrio cholerae* e *Vibrio parahaemolyticus* foi possível determinar, sem sombra de dúvida, qual o microrganismo em questão, mostrando a especificidade e poder de detecção automático, para além da apresentada nos ensaios com concentrados de DNA.

Com *E. coli* O157:H7 os testes realizados foram mais aprofundados, isto porque este é um dos mais importantes grupos de organismos patogéneos alimentares. Assim foram testados 4 pares de primers, todos eles específicos para factores de virulência apresentados por este microrganismo sendo a sua presença que define qual a categoria enterohemorrágica do organismo.

Os primeiros testes tiveram como alvo o plasmídeo pO157, de 60 Mda, que codifica uma enterohemolisina. Para tal foi utilizado o par de primers O157RFbE\_F/O157RFbE\_R nos 6 ensaios descritos nos resultados.

Quando testado em amostras de concentrado de DNA e de cultura, só não houve amplificação de DNA quando este se encontrava misturado com os DNA's de *Salmonella* sp e *Listeria monocytogenes*.

Os segundos ensaios focaram-se na toxina shiga ou verotoxina Stx1. Nos 4 ensaios descritos foram identificadas duas estirpes positivas quanto a este factor de virulência, no grupo de 12 estirpes de *E. coli*. A esta toxina está associada a

expressão e consequente produção de outro factor de virulência de teor proteico, intimina (Eae), sobre a qual se focaram os ensaios que se seguiram.

Este terceiro factor de virulência, (Eae), mostrou que mesmo existindo Stx1, nem sempre é produzido. Esta só foi positiva numa estirpe de *Esc. coli*, uma das que também apresentava os outros dois factores de virulência Stx1 e o plasmídeo O157.

Em relação ao último factor de virulência, H7flic, nos 4 ensaios realizados verificou-se que este factor apenas está presente na estirpe que possui todos os outros factores em simultâneo, *E. coli* O157:H7. Funciona em multiplex com o par de primer EaeF/EaeR, podendo assim ser feita uma identificação, em simultâneo, dos dois factores de virulência <sup>(14;15 e 16)</sup>.

No que concerne a *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* sp foram feitos os mesmos ensaios com DNA de cultura, resultando daqui uma identificação clara e precisa destas duas bactérias.

Muitos organismos patogéneos podem ser detectados simultaneamente num único PCR, denominado PCR multiplex. Este tipo de testes tem vindo a ser usado, com sucesso, também na área da microbiologia alimentar. (Franck, Bosworth & Moon, 1998; Trost et al, 1993 e Brasher et al, 1998).

Foi posta a possibilidade de identificação destes 3 microrganismos, *Esc. coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* sp a partir de uma amostra com os 3 DNA's misturados. Esta hipótese foi primeiramente testada em amostras de DNA concentrado, donde resultaram sempre 3 bandas bem definidas, quer os DNA's estivessem isolados, quer os DNA's estivessem misturados.

Já com DNA retirado de cultura verificou-se que só são produzidos produtos de PCR, em que os DNA's tenham um tamanho abaixo dos 1000pb. Nos ensaios realizados com *E. coli*, *Salmonella* e *Listeria monocytogenes*, no gel de agarose para verificação de PCR, apenas apareciam as bandas correspondentes a *Esc. coli* O157:H7 e *Salmonella* sp, as duas com tamanhos bastante inferiores a 1000pb. A banda referente a *Listeria monocytogenes* não foi produzida, o seu tamanho está entre os 500 e os 600pb, bastante grande e de amplificação mais difícil numa reacção de multiplex, a partir de DNA de cultura.

Com todos estes testes tornaram-se evidentes as características e capacidades desta técnica, como a eficácia de diagnóstico, ou seja, o grau de

resposta ao microrganismo alvo, o limite de detecção, onde ficou claro que este método é eficaz até 200pg de concentração de DNA.

Além destas características de teor técnico não nos podemos esquecer de que, apesar do investimento inicial de implementação da tecnologia de PCR, o tempo útil para o conhecimento dos resultados é reduzido enormemente em relação aos testes e exames realizados por métodos clássicos, sendo que todo este tempo ganho se virá a traduzir numa mais-valia a médio prazo.

Deve ter-se ainda em conta que os custos nas análises alimentares regulares realizadas por tecnologia de PCR, em comparação com métodos de diagnóstico clássico definidos pelas normas de standardização da ISO, não diferem em muito e que pela rapidez do alcance destes mesmos resultados, podem deste modo realizar-se um volume de análises muitíssimo maior.

Este trabalho pretende encorajar a implementação de métodos sensíveis e economicamente efectivos de detecção de organismos patogéneos alimentares, tornando-o numa ferramenta de diagnóstico fácil e rotineiro. Uma potencial prática diária em microbiologia alimentar.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Ray, Bibek, "Fundamental Food Microbiology", Third Edition, CRC Press, Florida, 2004, pp 5-9.
2. Ray, Bibek, "Fundamental Food Microbiology", Third Edition, CRC Press, Florida, 2004, pp 359-381.
3. Ray, Bibek, "Fundamental Food Microbiology", Third Edition, CRC Press, Florida, 2004, pp 395-403.
4. Olsen, J., "Probes and polymerase chain reaction for detection of food-borne bacterial pathogens", International Journal of Food Microbiology, 28, 2005, pp 1-78.
5. Fratamico, P., "Detection of *Escherichia coli* O157:H7 by Multiplex PCR", Journal of Clinical Microbiology, August 1995, pp 2188-2191.
6. A, Rozila, et al, "Rapid Molecular Detection of *Salmonella* Isolated from Poultry Farm", The 19<sup>th</sup> Veterinary Association Malaysia Congress, 3-5 August 2007: 201-203.
7. Malourny, B., et al, "Multicenter Validation of the Analytical Accuracy of *Salmonella* PCR: towards an International Standard", Applied and Environmental Microbiology, Jan 2003, pp 290-296.
8. Ul-Hassan, S., et al, "Rapid detection of *Salmonella* by polymerase chain reaction", Molecular and Cellular Probes, 18, 2004, pp 333-339.
9. Malourny, B. et al, "Standardization of diagnostic PCR for the detection of food-borne pathogens", International Journal of Food Microbiology, 83, 2003, pp 39-48.
10. Olsen, J., "DNA-based methods for detection of food-borne bacterial pathogens", Food Research International, 33, 2000, pp 257-266.
11. www.ISO.org
12. Naravaneni, R., "Rapid detection of food-borne pathogens by using molecular techniques", Journal of Medical Microbiology, 54, 2005, pp 51-54.
13. Maurer, J., "PCR Methods in Foods", Springer, USA, 2006, pp 42-48
14. Brown, T. A., "Gene cloning and DNA Analysis", 5<sup>th</sup> Edition, UK, 2006, pp 181-195.
15. Twyman, R. M., "Advanced Molecular Biology", UK, 1999, pp 279-284.
16. Turner, P. C. et al, "Molecular Biology", 2<sup>nd</sup> Edition, UK, 2000, pp 165-169.

