

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
COORDENAÇÃO DO CURSO SUPERIOR DE TECNOLOGIA EM ALIMENTOS
CURSO SUPERIOR DE TECNOLOGIA EM ALIMENTOS**

ANDIARA GONÇALVES

**DIAGNÓSTICO MOLECULAR PARA DETECÇÃO DE PATÓGENOS
ALIMENTARES EM EMBUTIDOS**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

PONTA GROSSA

2012

ANDIARA GONÇALVES

**DIAGNÓSTICO MOLECULAR PARA DETECÇÃO DE PATÓGENOS
ALIMENTARES EM EMBUTIDOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentada como requisito parcial à obtenção do título de Tecnólogo em Alimentos do Curso superior de Tecnologia em Alimentos, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Juliana Vitória
Messias Bittencourt

PONTA GROSSA

2012



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Campus Ponta Grossa
Coordenação do Curso Superior de Tecnologia em Alimentos
Curso Superior de Tecnologia em Alimentos



TERMO DE APROVAÇÃO

DIAGNÓSTICO MOLECULAR PARA DETECÇÃO DE PATÓGENOS ALIMENTARES EM EMBUTIDOS

por

ANDIARA GONÇALVES

Este Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) foi apresentado no dia 19 de dezembro de 2012 como requisito parcial para a obtenção do título de Tecnólogo em Alimentos. A candidata foi arguida pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

Profa. Dra. Juliana Vitoria Messias Bittencourt
Professora Orientadora

Profa. Me. Marjory Xavier Rodrigues
Membro titular

Profa. Dra. Sabrina Ávila Rodrigues
Membro titular

- O Termo de Aprovação assinado encontra-se arquivado na Secretaria Acadêmica -

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus “O Deus que faz tudo perfeito e cumpre o que promete. Ele é como um escudo para os que procuram a sua proteção” (Salmos 18:30).

A minha família em especial minha mãe Maria da Luz Duarte, pelo amor incondicional, compreensão e educação que me proporcionou.

A professora Dr^a. Juliana Vitória Messias Bittencourt pela sabedoria com a qual me auxiliou no amadurecimento pessoal e profissional durante suas orientações.

A toda equipe de colegas do laboratório: Marjory Xavier Rodrigues, Renata Samulak, Gabriela Felkel Sartori e Luciano Medina Macedo pelo apoio, incentivo e auxílio sempre que solicitado.

Ao meu noivo Marcos Mincov Tenório que mesmo distante teve paciência e me auxiliou em todos os momentos.

Enfim, a todos os que por algum motivo contribuíram para a realização desta pesquisa.

A mente que se abre a uma nova ideia
jamais voltará ao seu tamanho original.

Albert Einstein.

RESUMO

GONÇALVES, Andiara. **Diagnóstico molecular para detecção de patógenos alimentares em embutidos**. 2012. 30 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso superior em Tecnologia em Alimentos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Ponta Grossa, 2012.

Durante o processo de produção de embutidos há grande exposição a contaminação microbiológica. Dentre os principais microrganismos patogênicos que podem estar presentes neste tipo de produto a *Salmonella sp.* e *Staphylococcus aureus* destacam-se. A detecção de microrganismo patogênico é de suma importância visto que estes possuem potencial causador de toxinfecção alimentar. Atualmente, a detecção de microrganismo é amplamente realizada por técnicas de microbiologia convencional, as quais são morosas e muitas vezes podem acarretar em interpretações errôneas. Tecnologias opcionais de rápida execução vêm sendo desenvolvidas. A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é uma técnica molecular que além de possuir outras aplicações pode ser utilizada na determinação de microrganismos em alimentos. Deste modo, este trabalho visa aplicar diagnóstico molecular para detectar a presença de *Salmonella sp.* e *Staphylococcus aureus* em linguiças comercializadas na região dos Campos Gerais. Para tanto, foram coletadas 5 amostras de linguiça, as quais foram submetidas à pré-enriquecimento, extração de DNA e amplificação via PCR para os genes *coa* e *invA*. Os resultados obtidos foram ausência de *Salmonella sp.*, sendo concordado com a resolução vigente. Em contrapartida, para *S. aureus* observou-se que 100% das amostras analisadas apresentaram positividade, resultado este tolerado pela resolução vigente. Porém, a presença de *S. aureus* em alimentos é preocupante devido à produção de enterotoxinas termoestáveis produzidos por este microrganismo.

Palavras-chave: *Salmonella spp.* *Staphylococcus aureus*. linguiça. PCR.

ABSTRACT

GONÇALVES, Andiara. **Molecular diagnostics for the detection of food pathogens in sausage**. 2012. 30 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso superior em Tecnologia em Alimentos) - Federal Technology University - Parana. Ponta Grossa, 2012.

During the sausage production process occurs a large exposure to microbiological contamination. *Salmonella sp.* and *Staphylococcus aureus* are the main pathogenic microorganisms that may be present in this kind of product. The detection of pathogenic microorganisms has a major importance since they are potential agent of foodborne disease. Currently, the detection of microorganism is widely performed by conventional microbiological techniques, which are time consuming and can often lead to erroneous interpretations. Quick implementation technologies have been developed. The Polymerase Chain Reaction (PCR) is a molecular technique that can be used to food microorganisms determination but also has different applications. This project applies molecular diagnostics to detect *Salmonella sp.* and *Staphylococcus aureus* in sausages sold in the Campos Gerais region. Therefore we collect five samples of sausages then submitted to pre-enrichment, DNA extraction and PCR via amplification to *coa* and *invA* genes. The obtained results were the absence of *Salmonella sp.* which is acceptable for the resolution in force. In contrast, for *S. aureus* 100% of the samples showed the presence of this microorganism, but this result is also tolerated by the current resolution. However, the presence of *S. aureus* in food is worrying due the production of thermostable enterotoxins by this microorganism.

Keywords: *Salmonella spp.* *Staphylococcus aureus.* sausage. PCR.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1- Etapas da PCR | 5 |
| Figura 2– Amplificação do gene coa..... | 10 |
| Figura 3– Amplificação do gene InvA..... | 11 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 – Codificação das amostras | 6 |
| Tabela 2 – Sequência de oligonucleotídeos iniciadores..... | 7 |
| Tabela 3– Composição das reações de amplificação | 8 |
| Tabela 4 – Programações para realização das amplificações | 8 |
| Tabela 5 – Resultados das amplificações realizadas..... | 12 |

LISTA DE ABREVIATURAS

S. aureus *Staphylococcus aureus*

°C Grau Celsius

LISTA DE SIGLAS E ACRÔNIMOS

| | |
|-------------------|---|
| µg | Micrograma |
| µL | Microlitro |
| ADPT | Água destilada peptonada tamponada |
| DNA | Ácido desoxirribonucléico |
| DTA's | Doenças Transmitidas por Alimentos |
| ECP | Estafilococos coagulase positiva |
| EDTA | Brometo de cetiltrimetilamônio |
| <i>EEs</i> | Enterotoxinas estafilocócica |
| MgCL ₂ | Cloreto de magnésio |
| mL | Mililitro |
| mM | Milimolar |
| ng | Nanograma |
| OMS | Organização mundial da saúde |
| pb | Pares de base |
| PCR | Reação em Cadeia da Polimerase |
| RDC | Resolução da Diretoria Colegiada |
| RIISPOA | Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos |
| RPM | Rotação por minuto |
| SIP/POA | Serviço de Inspeção Estadual para Produtos de Origem Animal |
| TBE | Tris borato EDTA |
| U | Unidade |
| UFC | Unidades Formadoras de Colônia |

SUMÁRIO

| | | |
|-------|---|----|
| 1 | INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 1.1 | Doenças transmitidas por alimentos | 2 |
| 1.1.1 | <i>Salmonella sp.</i> | 2 |
| 1.1.2 | <i>Staphylococcus aureus</i> | 3 |
| 1.2 | Diagnóstico de patógenos..... | 4 |
| 2 | MATERIAL E MÉTODOS | 6 |
| 2.1 | Coleta e preparo das Amostras..... | 6 |
| 2.2 | Extração DNA | 6 |
| 2.3 | Reação de amplificação do DNA | 7 |
| 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 9 |
| 3.1 | Obtenção e amplificação de DNA das amostras..... | 9 |
| 3.2 | Presença de microrganismos nos embutidos avaliados..... | 10 |
| 4 | CONCLUSÃO..... | 13 |
| | Referências | 14 |

1 INTRODUÇÃO

De acordo com a Associação Brasileira da Indústria Exportadora de Carne Suína (ABIPECS), no ano de 2011 o Brasil exportou cerca de 516 mil toneladas de carne suína, ficando em quarto lugar no ranking mundial. Os relatórios anuais da ABIPECS mostram que a linguiça suína é a grande campeã na venda de derivados de carne suína. Esta representa 24% das vendas, ficando atrás apenas da carne suína “*in natura*” que lidera com 37% as vendas de toda a aquisição domiciliar de carne suína (ABIPECS,2011).

Dentre os derivados cárneos encontra-se os embutidos, cuja a preparação é realizada com carne picada e condimentada.

De acordo com o artigo 412 do RIISPOA (BRASIL,1997),

“Entende-se por "embutido" todo produto elaborado com carne ou órgãos comestível curado ou não, condimentado, cozido ou não, defumado e dessecado ou não, tendo como envoltório; tripa, bexiga ou outra membrana animal.”

Para a comercialização de produtos alimentícios é essencial à regularização adequada conforme seu padrão de qualidade e identidade, essa adequação é uma exigência dos órgãos vigentes como Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA).

No que se diz respeito à qualidade microbiológica e sanitária dos alimentos, o responsável pela determinação de padrões é ANVISA (BRASIL, 2001). O principal intuito da verificação da qualidade microbiológica se deve ao fato de muitos destes microrganismos serem causadores de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA's). Dentre os embutidos, a linguiça é o alimento mais suscetível à contaminação microbiológica. Pois são grandemente expostos à contaminação e representam um excelente meio para a multiplicação de microrganismos, por possuírem meio altamente nutritivo. As fontes de contaminação estão diretamente relacionadas com matéria-prima como: as carnes, as tripas ou envoltórios, os temperos ou condimentos, bem como a água. Vale resaltar que a higienização e as condições de fabricação devem ser levadas em conta, uma vez que uma fábrica mal estruturada tem o risco de contaminações durante o seu processo (MILANI et al., 2003; DIAS et al., 2008).

1.1 DOENÇAS TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS

As DTA's podem ser causadas por diversos microrganismos e/ou suas toxinas. As incidências de DTA's ocorrem devido a características como: controle inadequado de temperatura; manipulação incorreta dos alimentos; contaminação cruzada de alimentos crus ou processados (MILLÉO; PIETROWSKI; RANTHUM, 2009).

Os alimentos mais envolvidos em DTA's são frequentemente os de origem animal, sendo que as carnes ocupam o segundo lugar (OMS, 2002). Isto ocorre pois muitos agentes patogênicos são pertencentes à microbiota dos animais, em alguns casos estes ainda são transportado no ambiente de produção, via utensílios, manipulador, equipamento ou ainda pela água (SAMULAK et al., 2011).

Registros epidemiológicos oficiais apontam como os principais microrganismos causadores de DTA's a *Salmonella* sp. e o *Staphylococcus aureus* (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2012). A *Salmonella* sp e *S. aureus* são bactérias causadoras de doenças em humanos e animais, sendo transmitidas através do consumo e ingestão de alimentos contaminados.

1.1.1 *Salmonella* sp.

O gênero *Salmonella* é pertencente à família das Enterobactérias, é um dos gêneros mais envolvidos nos surtos de toxinfecção alimentar, por apresentar-se de diversas formas na natureza e possuir um elevado número de reservatórios.

São bacilos Gram-negativos não produtores de esporos, anaeróbios facultativos, produtores de gás a partir da glicose, capaz de utilizar citrato como única fonte de carbono. A maioria é móvel, através flagelos peritríquios, comporta-se como patógeno intracelular facultativo, possui como *habitat* o trato intestinal de homens e animais. Devido a sua capacidade de invasão celular, está associada sempre a problemas entéricos, septicêmicos e abortivos (MOREIRA, 2002; ANDRADE et al., 2010; FRANCO & LANDGRAF, 2002; BORSOI, 2009).

A presença de *Salmonella* sp. é considerada um problema de saúde pública, uma vez que a maioria dos sorotipos do seu gênero são patogênicos ao homem (SHINOHARA,2008).

1.1.2 *Staphylococcus aureus*

O gênero *Staphylococcus* são cocos Gram-positivos, que tendem ao agrupamento semelhante a cacho de uvas, pertencente à família *Micrococcaceae* (FRANCO; LANDGRAF, 2002; JAY, 2002). São anaeróbios facultativos e produtores de catalase quando em condição aeróbia. Este grupo de microrganismos possui a capacidade de sobreviver e se multiplicar em presença de até 15% de cloreto de sódio, também há registros que comprovam sua capacidade de multiplicação em meios que apresentam atividade de água inferior ao mínimo para outras bactérias halófilas (SANTANA et al., 2010).

S. aureus são bactérias mesófilas as quais possuem uma temperatura de crescimento na faixa de 7°C a 47°C, sendo o seu habitat distribuído em diversos espaços da natureza (FRANCO; LANDGRAF, 2002; JAY, 2002).

Este microrganismo é produtor de toxinas potencialmente virulentas, podendo muitas vezes ser estável ao calor e resistente a enzimas digestivas, possui estirpes produtoras de até 22 enterotoxinas causadoras de intoxicações alimentares, podendo comprometer o organismo humano em infecções sistêmicas, ocasionando septicemia, endocardite, choque tóxico e outras complicações, independente da faixa etária e do ambiente em que foi adquirida a infecção (ADWAN et al., 2005; ZOOCHE, 2008; NETTO et al., 2001)

Este microrganismo é responsável por uma diversidade de infecções em humanos e espécies animais, pois produz e secreta cerca de 30 diferentes fatores de patogenicidade os quais interferem na defesa do hospedeiro. Apesar do mecanismo de patogenicidade ainda não ser completamente esclarecido sabe-se que a produção e liberação de enterotoxinas estafilocócica (EEs) no alimento apresentam um risco à saúde (LUZ, 2008; STAMFORD et al., 2006).

Segundo Santana et al. (2010) as EEs são detectáveis nos alimentos apenas quando as contagens de *S. aureus* ultrapassam 10^6 UFC/mL ou g de alimento. Bassani (2009) estima que 1µg de toxina EEs é suficiente para causar a intoxicação.

1.2 DIAGNÓSTICO DE PATÓGENOS

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), na resolução RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001 (BRASIL, 2012) estabelece como indicadores de qualidade microbiológica um número máximo de *Estafilococos* coagulase positiva (ECP) por grama do produto e ausência de *Salmonella sp* em 25g.

Atualmente a necessidade de se diagnosticar a presença de microrganismos patogênicos nos alimentos é indispensável para obter qualidade e garantia da segurança alimentar (ABREU, 2007; JIN, YIN, YE, 2009).

Os métodos considerados oficiais para análise microbiológica de alimentos em origem animal e água são determinados pela Instrução Normativa nº 62 de 26 de agosto de 2003 (BRASIL, 2012). De acordo com esta, as técnicas empregadas são: pré-enriquecimento; enriquecimento seletivo; semeadura em meio sólido seletivo-diferencial; e identificação bioquímica e sorológica das colônias suspeitas. A obtenção de resultados através destas técnicas podem levar até 6 dias.

Embora esta metodologia apresente uma eficiência satisfatória, por já estar bem estabelecida, existem algumas desvantagens uma vez que seus procedimentos apresentam morosidade para obtenção destes resultados, isto porque tais técnicas são baseadas em testes fenotípicos, os quais demandam tempo maior de análise e muitas vezes seus resultados são considerados insatisfatórios pela dificuldade de interpretação (GANDRA et al. 2008; FREITAS et al. 2006).

Entre as técnicas de detecção de microrganismo destacam-se a biotipagem, que se baseia em reações bioquímicas; a fagotipagem, processo de identificação bacteriana que reconhece linhagens distintas, denominadas fagótipos, de uma mesma espécie de bactéria e ainda, a sorotipagem, que consiste nas reações antígeno-anticorpos (ARAUJO, 1998; SANTANA et al., 2011).

Novos métodos para detecção de microrganismos vêm sendo desenvolvidos. Com o avanço da biologia molecular possibilitou-se o desenvolvimento de técnicas como a reação em cadeia da polimerase (PCR). Sendo um método de ampliação rápida de segmentos específicos, a PCR possui como principal característica sua capacidade de produção exponencial de pequenas quantidades de material genético em horas. Esta técnica foi desenvolvida em 1983 e descrita em 1990 por Kary Mullis (BARE et al., 2004; CORDEIRO, 2003; VIANEZ JUNIOR, 2007).

A PCR é realizada em três principais etapas (Figura 1), são elas: desnaturação, hibridização e extensão.

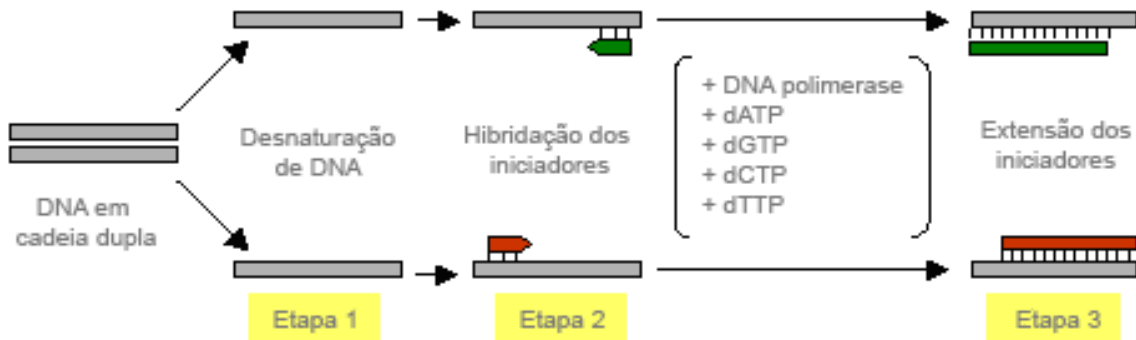


Figura 1- Etapas da PCR
Fonte- Adaptado de BITTENCOURT; LIMA, 2008

Estas três principais etapas são realizadas em ciclos, sendo repetidos em média de 30 a 40 vezes. Na desnaturação acontece a quebra de pontes de hidrogênio nas bases nitrogenadas, esta etapa geralmente ocorre entre 92°C e 95°C. Já a hibridização (ligação com o iniciador) pode variar de acordo com a sequência do oligonucleotídeo utilizado, nessa fase que ocorre o anelamento entre o iniciador e a molécula de DNA alvo. Esta variação de temperatura depende da sequência do iniciador. Por fim a fase de extensão na qual as ligações mais estáveis permitem que o DNA polimerase sintetize uma fita complementar de DNA (VIANEZ JUNIOR, 2007; CORDEIRO, 2003; BITTENCOURT; LIMA, 2008).

O objetivo deste trabalho foi aplicar a técnica de diagnóstico molecular via PCR para verificação da presença de *Salmonella sp.* e *Staphylococcus aureus* em embutidos cárneos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 COLETA E PREPARO DAS AMOSTRAS

Coletaram-se cinco amostras de linguiças com registro de inspeção estadual no comércio de varejo de Ponta Grossa – PR. Na seleção das amostras foram priorizadas as que possuem sua produção na região. As amostras foram encaminhadas para o laboratório de Bioengenharia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, *câmpus* Ponta Grossa, em caixa térmica com gelo, a fim de manter a qualidade do produto. Foram recepcionadas e codificadas do número 1 ao 5 (Tabela 1).

Tabela 1 – Codificação das amostras

| Código | Produto | Tipo de registro |
|--------|-----------------------------|------------------|
| 1 | Linguiça frescal | SIP/POA |
| 2 | Linguiça blumenal | SIP/POA |
| 3 | Linguiça calabresa | SIP/POA |
| 4 | Linguiça frescal suína fina | SIP/POA |
| 5 | Linguiça toscana | SIP/POA |

Fonte: Autoria Própria, 2012.

Em seguida foram encaminhadas ao laboratório de Microbiologia, para realização do pré-enriquecimento, esta fase visa à recuperação de células injuriadas. Para tanto as amostras foram inoculadas em ADPT estéril (água deionizada peptonada tamponada) utilizada como meio de pré-enriquecimento, na proporção de 25g de amostra para 225mL de ADPT. Incubaram-se as amostras por 24 horas a 37°C. Em seguida estas foram submetidas ao processo de extração de DNA.

2.2 EXTRAÇÃO DNA

Para a realização da técnica PCR é fundamental a extração de DNA de qualidade da amostra que será analisada,. Visando redução de custos e tempo

realizou-se a técnica de extração de DNA por lise térmica descrita por Rodrigues et. al (2012).

Após o período de incubação, alíquotas de 1,5 mL foram transferidas para microtubos, em seguida estes foram centrifugados a 5000 RPM por 10 minutos, descartou-se o sobrenadante o pellet foi ressuspenso em 1 mL de água ultra-pura, seguiu o processo homogeneizando os microtubos em vortex por 1 minuto e centrifugando os mesmo a 12000 RPM por 3 minutos. Descartou-se o sobrenadante e resuspendeu o pellet em 200 µL de água ultra-pura. Aqueceram-se as amostras em banho seco a 95°C por 10 minutos acompanhados de congelamento a -20°C por 30 minutos. Após retirar as amostras do congelamento mantiveram-se as amostras a 65°C por 1 minuto, que em seguida foram centrifugadas a 12000 RPM por 10 minutos. Retirou o sobrenadante contendo o DNA que foi transferido para novos microtubos, estes foram mantidos a -20°C até o momento da realização da reação da PCR.

2.3 REAÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO DO DNA

Para realização da amplificação do DNA se faz necessário à utilização de oligonucleotídeos iniciadores, os quais se ligam a partes específicas do genoma para identificação do gene. Com base na literatura consultada para a detecção dos microrganismos alvo foram determinados os oligonucleotídeos iniciadores **coa** para a detecção de *S. aureus* e **InvA** para *Salmonella sp*, os quais são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – Sequência de oligonucleotídeos iniciadores

| Microrganismo | Oligonucleotídeos iniciadores | Gene Alvo | Tamanho | Referência |
|-----------------------|---|------------------|---------------------------------|---|
| <i>S. aureus</i> | 5'-ACCACAAGGTACTGAATCAACG- 3' 5'- TGCTTCGATTGTTTCGATGC- 3' | Coa | Variável 612 pb – 1000 pb | VIEIRA-DA-MOTTA et al., 2001; LUZ, 2008 |
| <i>Salmonella sp.</i> | 5'- TGCCTACAAGCATGAAATGG-3' 5'- AAAGTGGACCGGTGA AA- 3' | InvA | 457 pb | MALDONADO, 2008 |

Fonte: Autoria Própria, 2012

As reações de amplificação das amostras de DNA obtidas foram realizadas de acordo com especificações descrita por Luz (2008) e Maldonado (2008) para *S. aureus* e *Salmonella* sp, respectivamente, conforme mostra a Tabela 3 .

Tabela 3– Composição das reações de amplificação

| Componentes | Concentração | |
|------------------------------|---|--|
| | Gene <i>coa</i> (<i>S. aureus</i>) | Gene <i>InvA</i> (<i>Salmonella</i> sp.) |
| DNA genômico | Aprox. 40 ng | Aprox. 20 ng |
| Tampão PCR 10x | 1x | 1x |
| MgCl ₂ | 1,5 mM | 0,75 mM |
| Oligonucleotídeo iniciador F | 1 µM | 1 µM |
| Oligonucleotídeo iniciador R | 1 µM | 1 µM |
| dNTP's | 200 µM | 0,2 mM |
| Taq DNA polimerase | 1,5 U | 1,5 U |
| Água deionizada estéril | Volume necessário para completar 25 µL | |

Fonte: Adaptado de Rodrigues et al.,2012

As amostras foram amplificadas no Termociclador Therm-1000/ Maxygene Versão nº 1.4 em programações específicas (Tabela 4) para a amplificação de DNAs.

Tabela 4 – Programações para realização das amplificações

| | Gene <i>coa</i> | | Gene <i>InvA</i> | |
|----------------------|-----------------|---------|------------------|---------|
| | Temperatura | Tempo | Temperatura | Tempo |
| Desnaturação inicial | 95°C | 5 min. | 94°C | 5 min |
| Desnaturação | 95°C | 30 seg. | 94°C | 1 min. |
| Hibridização | 55°C | 2 min. | 57°C | 30 seg. |
| Extensão | 72°C | 4 min. | 72°C | 1 min. |
| Extensão final | 72°C | 10 min. | 72°C | 5 min. |

Fonte: Adaptado de Rodrigues et al.,2012

Para realizar a avaliação do produto da PCR utilizou-se o sistema de eletroforese com gel de agarose (1,5%) em cuba horizontal com tampão de corrida TBE (EDTA pH 8,0 0,5M; Tris-Base; Ácido Bórico; água destilada). Após ser submetido por uma corrente elétrica o gel foi corado com brometo de etídio a 0,5µg/mL durante 15 minutos.

Os resultados foram visualizados via aparelho transiluminador em sistema digital. Para a observação do produto da PCR as bandas foram comparadas com um padrão de peso molecular de 100 pares de base.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 OBTENÇÃO E AMPLIFICAÇÃO DE DNA DAS AMOSTRAS

A extração DNA tem como principal função o rompimento da parede celular para a exposição do DNA da célula (ROSA, 2008). Nesta etapa do processo optou-se por uma metodologia simples visando à otimização da análise e redução de custos. Como relatado por Flôres et al., (2001) o custo por amostra para realizar a técnica de extração por fenol é duas vezes maior do que a metodologia de lise térmica.

A primeira etapa da extração do DNA foi a fase de pré-enriquecimento, realizada para restauração de células injuriadas. Visando, portanto, a obtenção de um DNA de boa qualidade, pois a obtenção do DNA bacteriano em matrizes complexas apresenta grandes dificuldades, por possuírem interferentes que não permitem a purificação do DNA (TIMS; LIM, 2003).

Diversos autores relatam a dificuldade de extração de DNA bacteriano, principalmente as bactérias Gram-positivo, como *S.aureus*. No estudo descrito por Zocche (2008) é relatada a utilização de enzimas, solventes orgânicos ou ainda a quebra mecânica da parede celular, para obtenção do DNA. Em contrapartida durante a realização deste trabalho observou-se que não foi necessária à utilização desses artifícios, apenas a metodologia de choque térmico foi suficiente para extração do DNA bacteriano de boa qualidade, sendo este utilizado para amplificação na forma pura, ou seja, sem nenhum processo de purificação ou ainda diluição

A escolha dos oligonucleotídeo iniciador também é uma etapa importante e determinante para o experimento. Maldonado (2008), afirma a importância desta escolha, sendo que as sequências escolhidas devem ser específicas para o patógeno alvo.

O oligonucleotídeo iniciador codificador do gene **coa** expressa à produção da enzima coagulase, este é o principal critério para avaliação microbiológica na identificação de *S. aureus* (LUZ, 2008). O oligonucleotídeo iniciador codificador do gene **InvA** foi capaz de detectar com sucesso 626 estirpes de *Salmonella spp* em uma pesquisa realizada por Rahn et al., (1992). Afirmando, portanto, a alta

especificidade e sensibilidade da utilização dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados no experimento.

3.2 PRESENÇA DE MICRORGANISMOS NOS EMBUTIDOS AVALIADOS

Quando realizado o diagnóstico nos embutidos coletados para a presença de *Estafilococos* foi verificada a presença de 100% nas amostras, como apresentado na Figura 2.

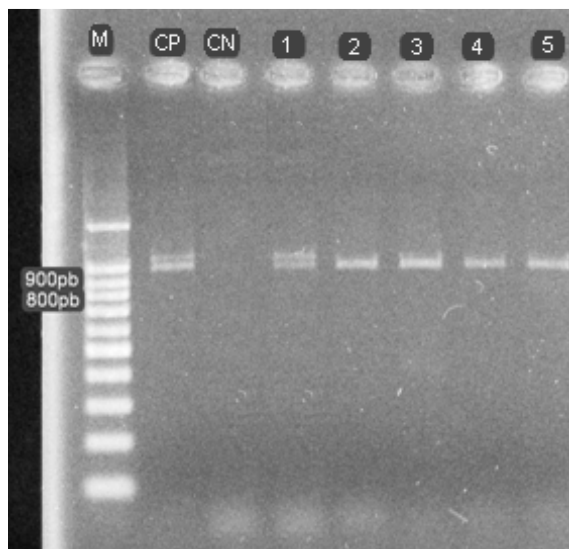


Figura 2– Amplificação do gene *coa*
Fonte: Autoria Própria

M: Marcador de peso molecular; CP: controle positivo (ATCC 25923 – *S. aureus*), CN: controle negativo (água deionizada estéril); 1: linguiça frescal; 2: linguiça blumenau; 3: linguiça calabresa; 4: linguiça fina frescal; 5: linguiça toscana.

Registros de outros trabalhos também demonstram a presença deste microrganismo por diagnóstico molecular, onde verificaram em 100% das amostras (leite bovino) positivas para a presença do gene *coa* (codifica coagulase), e os testes fenotípicos utilizados apresentaram resultados variáveis, isto evidencia que embora as estirpes possuam o gene *coa* podem não expressam coagulase livre (VIEIRA DA MOTTA et al., 2001).

A presença de *Estafilococos* coagulase positiva em alimentos indicam falhas no processamento, armazenamento ou comercialização. Além disso, para a indústria alimentícia há a preocupação com a presença de toxinas, visto que linhagens de *S. aureus* são capazes de produzir enterotoxinas termoestáveis. Tornando portanto, a

identificação deste microrganismo indispensável uma vez que as principais enterotoxinas causadores de DTA's são produzidas por este microrganismo (LUZ, 2008)

A grande vantagem da técnica de PCR é a capacidade de detectar genes que determinam a produção das toxinas estafilocócicas. Demonstrando o potencial de toxigenicidade de *S. aureus* (LUZ, 2008). A principal desvantagem desta é não fazer diferenciação entre células viáveis e não viáveis para a detecção do patógeno (GANDRA, 2008), não podendo ser única forma de análise em caso de microrganismo que necessita de quantificação.

De acordo com os resultados obtidos não houve a ocorrência da presença de *Salmonella sp.* nas amostras analisadas. Esse resultado pode ser observado na Figura 3. Sendo, portanto as amostras analisadas neste aspecto, alimentos propícios para consumo de acordo com a Resolução - RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001 (BRASIL, 2012). Maldonado (2008) relata que a utilização do oligonucleotídeo iniciador do gene *InvA*, pode detectar com sucesso 99,4% das estirpes de *Salmonella sp.*, corroborando os resultados obtidos.

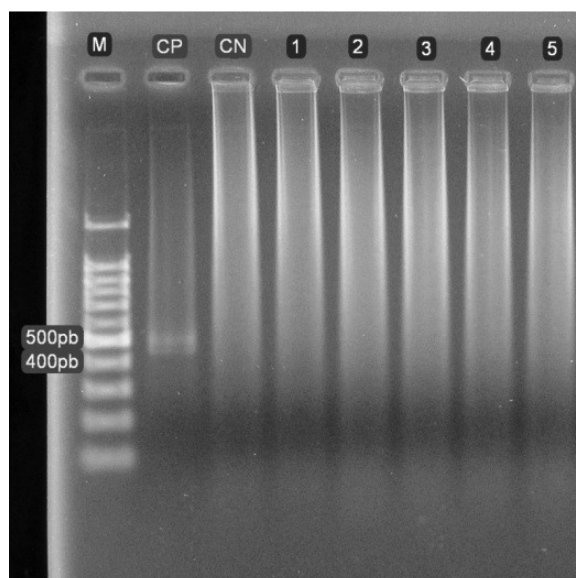


Figura 3– Amplificação do gene *InvA*

Fonte: Autoria Própria

M: Marcador de peso molecular; CP: controle positivo (ATCC 9184 – *Salmonella gallinarum*), CN: controle negativo (água deionizada estéril); 1: linguiça frescal; 2: linguiça blumenau; 3: linguiça calabresa; 4: linguiça fina frescal; 5: linguiça toscana.

Em estudos realizados acerca da presença de *Salmonella sp.* em produtos frescos suínos, foram encontrados cerca de 2% de alimentos contaminados no

estado do Paraná (REIS et al., 1995). A presença da *Salmonella sp.*, em alimentos é causadora de salmoneloses e diversas doenças como febre tifóide, bacteremia, gastrinterite e infecções focais (MALDONADO, 2008).

Em pesquisa realizada por Felix (2012), com 171 amostras de linguiças apenas duas apresentaram contaminação por *Salmonella sp.*, este resultado mostra que a ausência deste microrganismo não significa a ausência de outros microrganismos patógenos.

A Tabela 5 apresenta o sumário dos resultados obtidos, com os quais pode-se dizer que a partir das análises realizadas as linguiças comercializadas em Ponta Grossa estão expostas a contaminação por Estafilococos, sendo ausente presença de *Salmonella sp.*.

Tabela 5 – Resultados das ampliações realizadas

| Código | Amostra | Resultado | |
|--------|-----------------------------|------------------|-----------------------|
| | | <i>S. aureus</i> | <i>Salmonella sp.</i> |
| 1 | Linguiça frescal suína | + | - |
| 2 | Linguiça blumenal | + | - |
| 3 | Linguiça calabresa | + | - |
| 4 | Linguiça frescal suína fina | + | - |
| 5 | Linguiça toscana | + | - |

Fonte: Aatoria Própria, 2012

Esse resultado evidencia a necessidade de implantação de medidas higiênico-sanitárias durante todo processamento dos produtos, incluindo instalações, equipamentos, utensílios e manipuladores visto que esses patógenos podem colonizar superfícies mal higienizadas. Também é necessário o uso de medidas preventivas no armazenamento e comercialização. Tais medidas melhoram a qualidade microbiológica do produto final garantindo assim segurança alimentar.

4 CONCLUSÃO

Metodologias inovadoras em diagnósticos de patógenos são de grande interesse, pois a detecção de microrganismo, de forma rápida e específica é de extrema importância. No entanto, para implementação das técnicas de análise mostrada faz-se necessário a padronização de protocolos e a validação dos mesmos em diversas matrizes de alimentos, todo este processo demanda tempo e custos.

Pode-se concluir que a técnica utilizada demonstrou-se eficiente para o desenvolvimento do trabalho proposto e os resultados obtidos foram satisfatórios em relação à *Salmonella sp.*

De acordo com o resultado obtido em relação a *Estafilococcus*, as amostras devem ser submetidas a microbiologia convencional, para contagem de células, verificando se as amostras estão dentro do padrão estabelecido. Caso ocorra a confirmação do excesso da presença deste microrganismo, ações corretivas devem ser realizadas no processamento.

REFERÊNCIAS

ABREU, A. de. **Esforço para inovação tecnológica: uma caracterização da indústria de alimentos município de Marília/SP**. 2007. 189 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia da Produção) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2007.

ADWAN, G. ; ABU-SHANAB, B.; ADWAN, K. Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in Raw Milk in the North of Palestine. Turkish **Journa of Biology**, v.29, p. 229 - 232, 2005

ANDRADE, R.b. et al. Métodos diagnósticos para os patógenos alimentares: *Campylobacter sp.*, *Salmonella sp.* e *Listeria imonocytogenes*. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v. 77, n. 4, p.741-750, out/dez. 2010.

ARAUJO, Wanderley Pereira de. **Fagotipagem de cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a antibióticos, isoladas de leite**. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* [online]. 1998, vol.35, n.4, pp. 00-00.

BARE, Jaqueline A. et al. Extração de DNA de materiais de arquivo e fontes escassas para utilização em reação de polimerização em cadeia (PCR). **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapiar**, São Paulo, v. 4, n. 26, p.274-281, out/dez. 2004.

BASSANI, M. T. M. S. **Caracterização de grupos agr e sua relação com perfil enterotoxigênico e antimicrobiano em *Staphylococcus aureus* isolados de diferentes origens**. 2009. 70f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Agronomia “Eliseu Maciel”, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

BITTENCOURT, Juliana Vitória Messias; LIMA, Milena de Luna Alves. **Manual de Biologia Molecular: Em plantas arbóreas**. São Paulo: Nirtoccecon, 2008.

BORSOI, A. **Inoculação *Salmonella heidelberg* e *Salmonella enteritidis* em pintos de corte para a avaliação da morfometria cecal, invasibilidade, persistência de excreção fecal e o uso de ácido orgânico e óleo essenciais no controle de *Salmonella enteritidis***. 2009. 107 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Org.). **Resolução - RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001**. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_01rdc.htm>. Acesso em: 11 mar. 2012.

BRASIL. **Decreto nº 30.691, de 29 de março de 1952.** Aprova o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal RIISPOA. Alterado pelos decretos 1255 de 25/06/62; 1236 de 02/09/79; 1812 de 08/02/96 e 2244 de 04/06/97. Diário Oficial. Brasília, p. 240, 1997

BRASIL. **Instrução Normativa nº 62 de 26 de agosto de 2003.** Oficializa métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água. Anexo I. Publicado no Diário Oficial da União de 18/09/2003, Seção 1, Página 14. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=2851>>. Acesso em: 06 ago. 2012.

CORDEIRO, M. C. R. EMBRAPA. **Engenharia Genética: conceitos básicos, ferramentas e aplicações.** Doc 86. 2003. p. 23-24.

DIASP.A., Conceição R.C.S. da, Coelho F.J.O., Tejada T.S., Segatto M. & Timm C.D. Qualidade higiênico-sanitária de carne bovina moída e de embutidos frescos comercializados no sul do Rio Grande Do Sul, Brasil. **Arq. Inst. Biol.**, 75:359- 363, 2008

FELIX. A.S. et al., INVESTIGAÇÃO DA PRESENÇA DE *Salmonella spp.* EM LINGUIÇAS TIPO FRESCAL, MISTA E CASEIRA, VENDIDAS A GRANEL COMERCIALIZADAS NO MUNICÍPIO DE GOVERNADOR VALADARES. Disponível em: <<http://www.pergamum.univale.br/pergamum/tcc/Investigacaodapresencadesalmonellasspemplinguicastipofrescalmistaecaseiravendidasagranelcomercializadasnomunicipiodegovernadorvaladares.pdf>>. Acesso em: 06 dez 2012.

FLÔRES, Maristela Lovato et al. **MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE DNA PARA A DETECÇÃO DE *Salmonella* EM OVOS DE GALINHAS, COM E SEM CASCA, ATRAVÉS DA REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE.** *Cienc. Rural* [online]. 2001, vol.31, n.2, pp. 315-318.

FRANCO, B. D.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos.** São Paulo: Atheneu, 2002.

FREITAS, E. I.; LEMOS, A.A.; MARIN, V.A. Validação de métodos alternativos qualitativos na detecção de patógenos alimentares. **Ciência & Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v.11, n.4, p.1073-1083, 2006.

GANDRA, E.A. et al. Técnicas moleculares aplicadas à microbiologia de alimentos. **Acta Sci. Technol.**, Maringá, v. 30, n. 1, p.109-118, 2008.

JAY, James M.. **Microbiología Moderna de Los Alimentos**. 4. ed. Zaragoza: Acribia S.a., 2002.

JIN, S.Q.; YIN, B.C.; YE, B.C. Multiplexed Bead-Based Mesofluidic System for Detection of Food-Borne Pathogenic Bacterium. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 21, p. 6647–6654, nov. 2009.

LUZ, I. S. **Caracterização molecular das toxinas em *Staphylococcus aureus* isolados de leite e queijo de coalho em municípios da região agreste de Pernambuco**. 2008. 126f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2008.

MALDONADO, A. G. Ocorrência de *Salmonella* spp. em amostras de carcaças e miúdos de frango obtidas em uma feira e um mercado municipal na zona oeste da cidade de São Paulo: análise crítica entre a técnica convencional em meios de cultivo e reação em cadeia pela polimerase - PCR. 2008. 75f. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia Experimental e Aplicada a Zoonoses) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2008.

MILANI, Liana Inês Guidolin et al. Bioproteção de lingüiça de frango. **Ciênc.. Tecnol. Aliment.** [online]. 2003, vol.23, n.2, pp 161-166.

MILLÉO, Denise; PIETROWSKI, Giovana de A. Moura; RANTHUM, Marly. **Apostila de aulas teóricas e praticas**. Ponta Grossa, 2009.

MOREIRA, A.P.O. **Pesquisa de *Salmonella sp.* em frangos de corte de um dia de idade da Região Metropolitana de Fortaleza-CE**. 2002. 56 f., Dissertação (Mestrado em Ciências veterinárias) - Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2002.

NETTO, Martin Zavadinack et al. *Staphylococcus aureus*: incidência e resistência antimicrobiana em abscessos cutâneos de origem comunitária. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 23, n. 3, p.709-712, maio 2001.

OMS. Organização Mundial da Saúde. Emerging foodborne disease. Fact Sheet, n.124, **revised January** 2002. Disponível em: <http://www.who.int/inffs/in/fact124.html>. Acesso em: 04 de dez de 2012.p. 229 - 232, 2005

RAHN, K et al. Amplification of the *invA* gene sequence of *Salmonella typhimurium* by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*. **Molecular and Cellular Probes**, v.6, p217- 279, 1992.

REIS, R. B.; KRUGER, C. S.; MACIEL, M. S. *Salmonella spp.* em produtos cárneos comercializados no município de Cuiabá- MT. Avaliação da metodologia de pesquisa. Modelos de resistência a drogas antimicrobianas. **Ciência Tecnologia de Alimentos**, v. 15, n. 1, p. 74-78, 1995.

RODRIGUES, Marjory Xavier et al. **Diagnóstico molecular para detecção de patógenos alimentares em embutidos**. In: Congresso Agropecuário, Industrial e Tecnológico do Paraná, 1., 2012, Ponta Grossa.

ROSA, D. D. Método rápido de detecção de bactérias. **Summa Phytopathol**, v. 34, n. 3, p. 259-261,

SAMULAK, R. L.; ZANETTI, G. F.; RODRIGUES, S. A.; BITTENCOURT, J. V. M. Condição higiênico-sanitária de abatedouro frigorífico e fábrica de embutidos no estado do Paraná. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**. Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). v. 05, p. 408-417, 2011,

SANTANA, Eliete Souza et al. ABORDAGEM SOBRE *Salmonella sp.* COM ENFOQUE NA CARACTERIZAÇÃO, PATOGÊNESE E MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO EM AVES. In: **ENCICLOPÉDIA BIOSFERA**. 7. ed. Goiânia: Centro Científico Conhecer, 2011. p. 1-23.

SANTANA, Elsa Helena Walter et al. ASSESSMENT OF THE RISK OF RAW MILK CONSUMPTION RELATED TO STAPHYLOCOCCAL FOOD POISONING. **Ciencia Animal Brasileira**, Goiania, v. 11, n. 3, p.643-652, jul/set 2010.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. **Dados epidemiológicos- DTA período de 2000 a 2011**. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/dados_epidemiologicos_dta_15911.pdf>. Acesso em: 20 abr. 2012.

SHINOHARA, Neide Kazue Sakugawa et al. ***Salmonella spp.*, importante agente patogênico veiculado em alimentos**. *Ciênc. saúde coletiva* [online]. 2008, vol.13, n.5, pp. 1675-1683.

SPRICIGO, Denis Augusto; MATSUMOTO, Suzana Ribeiro; ESPINDOLA, Misael Leopoldo and FERRAZ, Sandra Maria. Prevalência, quantificação e resistência a antimicrobianos de sorovares de *Salmonella* isolados de lingüiça frescal suína. **Ciênc. Technol. Aliment.** [online]. 2008, vol.28, n.4, pp. 779-785.

STAMFORD, Tânia Lúcia Montenegro; Silva, C. G. M; Mota, R. A. (2006). Enterotoxigenicidade de *Staphylococcus* spp Isolados de leite in natura. **Ciênc.. Tecnol. Aliment.**, 26, 41-45

TIMS, T. B., and D. V. LIM. 2003. Confirmation of viable *E. coli*O157:H7 by enrichment and PCR after rapid biosensor detection. *J. Microbiol. Methods* **55**:141-147.

VIANEZ JUNIOR, João Lídio da Silva Gonçalves. **Bioinformática aplicada no desenho de indicadores para genes funcionais: degradação de herbicida 2,4-D: estudo de caso.** 2007. 148 f. - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.

VIEIRA-DA-MOTTA, O. et al. Detection of different *Staphylococcus aureus* strains in bovine milk from subclinical mastitis using PCR and routine techniques. **Braz. J. Microbiol.**, v.32, n.1, p. 27-31, 2001

ZOOCHE, Fernando. ***Staphylococcus aureus* enterotoxigênicos: PCR para detecção em queijo minas frescal e caracterização do agrupamento *egc* em isolados obtidos em alimentos de origem animal.** 2008. 102f. Tese (Doutorado). Programa de Pós- graduação em Ciências e Tecnologia Agroindustrial. Universidade Federal de Pelotas.