

# Padronização da técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) para detecção de micro-organismos patogênicos em amostras de leite bovino *in natura* oriundas de produtores do Vale do Taquari, RS.

Débora Mara Kich<sup>1</sup>, Camila Agostini<sup>1</sup>, Adriane Pozzobon<sup>1</sup>, Ivan Cunha Bustamante-Filho<sup>2</sup>, Cláudia Majolo<sup>3</sup>, Cláucia Fernanda Volken de Souza<sup>4</sup>, Vanderlei Biolchi<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, <sup>2</sup> Centro de Gestão organizacional, <sup>3</sup> Unianálises, <sup>4</sup> Centro de Ciência e Tecnologia, Univates, <sup>5</sup> Departamento de Fisiologia, ICBS, UFRGS

## Introdução:

A região do Vale do Taquari, RS é um importante pólo de produção leiteira no Rio Grande do Sul. Boa parte do leite e derivados consumidos na região é proveniente do mercado informal, de pequenos produtores da região. O leite e seus derivados são frequentemente contaminados por uma série de patógenos, entre estes, os *Staphylococcus aureus* e a *Listeria monocytogenes*. O *S.aureus* é uma bactéria presente na maior parte dos ambientes ocupados pelo homem, podendo contaminar, inclusive, sua pele, o que facilita a transmissão desta bactéria pelas mãos. A *L. monocytogenes* é um importante patógeno de origem alimentar causando a Listeriose.

## Objetivo:

Utilizar a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) na detecção da bactéria *L. monocytogenes* e *S. aureus* em amostras de leite bovino *in natura* provenientes de produtores da região do Vale do Taquari.

## Materiais e Métodos:

Para controle positivo foram feitas contaminações artificiais de leite com diferentes concentrações de *S. aureus* e *L. monocytogenes* ( $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$  e  $10^7$  UFC/mL) e processadas junto com as amostras de oito produtores locais. As amostras estão sendo submetidas a diferentes protocolos de isolamento do DNA bacteriano para posterior detecção pela técnica de PCR. Até o presente momento foram testados 6 protocolos de isolamento de DNA: 1- fenol-clorofórmio-isoamílico 2- isotiocianato de Guanidina 3- Kit comercial PrepMan (Applied Biosystems®), 4- fenol e proteinase k, 5-protocolo de Ahmadi (2010) com modificações e 6- kit Chemagic (Chemagem®). Para a PCR utilizou-se a Supermix Invitrogen® e os primers específicos.

**Conclusão:** Até o momento a presença de *L. monocytogenes* não foi detectada em nenhuma das amostras de leite dos 8 produtores locais submetidas aos seis protocolos testados nem em testes microbiológicos e bioquímicos. A presença de *S. aureus* foi detectada com protocolo 6 nas amostras B, C, D, F, G e H e também com análises microbiológicas e bioquímicas. Percebe-se que deverão ser testados protocolos diferentes para a detecção de *S. aureus* e *L. monocytogenes*.

## Resultados:

Dos protocolos testados até o presente momento foi obtida a identificação do produto de 702 pb (pares de bases) correspondente a *L. monocytogenes* na concentração de  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$  e  $10^6$  UFC/mL utilizando o protocolos 4,  $10^2$  e  $10^4$  UFC/ml com o protocolo 3 e  $10^6$   $10^7$  UFC/ml com o protocolo 6. E o produto de 132 pb correspondente ao *S. aureus* na concentração de  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$  e  $10^7$  UFC/mL utilizando o protocolo 6 e  $10^6$  e  $10^7$  UFC/mL com o protocolo 5.

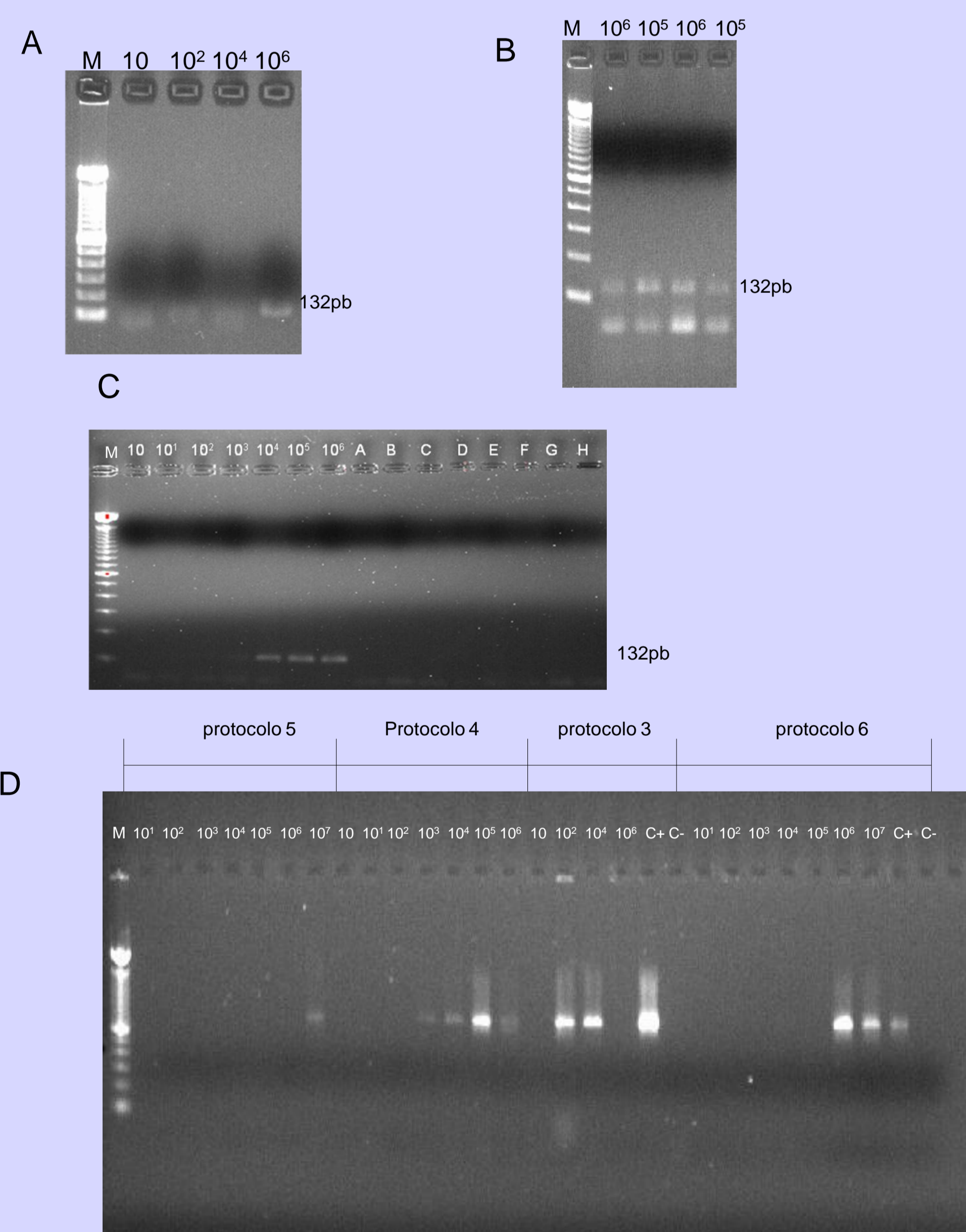


Figura A. Gel de agarose 2% para a detecção *S. aureus* utilizando o protocolo 4. B. Gel de agarose 2% para detecção de *S. aureus* utilizando o protocolo 5. C. Gel de agarose 2% para detecção de *S. aureus* utilizando o protocolo 6. D. Gel de agarose 2% para detecção de *L. monocytogenes* utilizando os protocolos 3,4,5 e 6. M= marcador de peso molecular 100pb. A a H amostras de produtores locais

