

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.

Camila Agostini¹, Bruna Jordon², Caroline Kreling³, Débora Kich⁴, Ivan Cunha Bustamante-Filho⁵, Claudia Majolo⁶, Claucia Fernanda Volken de Souza⁷, Adriane Pozzobon¹ (orientador)

¹*Faculdade de Biomedicina, Centro Universitário UNIVATES*

Resumo

O leite é considerado um dos mais completos alimentos por apresentar vários elementos importantes para a nutrição humana, como materiais orgânicos e nitrogenados, caseína e albumina, necessárias para a constituição dos tecidos e sangue, sais minerais para a formação do esqueleto e vitaminas. (MESQUITA et al, 2004) O Vale do Taquari possui em sua constituição econômica e social, a produção de leite como importante fator para o seu desenvolvimento. Portanto, atenta-se para a importância e relevância do controle sanitário do leite bovino *in natura* comercializado na região, por este motivo é essencial que os produtores trabalhem de acordo com a legislação visando o controle de qualidade dos alimentos, assim como, preservando a saúde da população. É sabido que o leite bovino *in natura* pode conter microorganismos patogênicos como a *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* sendo então, prejudiciais à saúde do seu consumidor. A técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) consiste na multiplicação de um trecho específico de DNA através de ciclos de alteração de temperatura, agilizando de maneira eficaz a detecção do patógeno em consideração. O presente estudo tem por finalidade detectar a presença de *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* pela técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em amostras de leite bovino *in natura* oriundas de produtores do Vale do Taquari, RS. Mensalmente são coletadas amostras de produtores locais para posterior análise utilizando-se diferentes protocolos de isolamento do DNA bacteriano para a detecção através da PCR.

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. O presente estudo tem como objetivo principal 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.

Metodologia

Para controle positivo foram feitas contaminações artificiais de leite integral obtendo as seguintes 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 tamponado e proteinase k, 5- protocolo de Ahmadi (2010) com modificações e 6- kit Chemagic (Chemagem®).

Resultados (ou Resultados e Discussão)

Os protocolos 5 e 6 utilizam além da enzima proteinase K a Lisozima. 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 10^6 e 10^7 UFC/mL utilizando os protocolos 4, 5, 6 e o 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. O protocolo 4 detectou apenas 10^7 UFC/mL que é considerada alta contaminação. Ainda estão sendo feitas alterações na padronização de um protocolo experimental com bases no estudo feito por Ahmadi (2010), visando aumentar a sensibilidade para detecção de baixas contaminações (inferior a 10^4 UFC/mL) sem ser necessário o uso de kit comercial que apresenta custo elevado.

Conclusão

A presença de *S. aureus* e *L. monocytogenes* não foi detectada em nenhuma das amostras de leite dos oito produtores locais submetidas aos seis protocolos testados, o que pode indicar ausência destes patógenos ou baixa contaminação cujos protocolos testados não conseguiram detectar.

Referências

AHMADI M , ROHANI SMR, AYREMLOU, N . Detection of *Staphylococcus aureus* in milk by PCR. **Comp Clin Pathol** 19:91–94, 2010

MESQUITA, I.V.U.; MEDEIROS A.N. Efeito da dieta na composição química e características sensoriais do leite de cabras. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**. Juiz de Fora: v. 59, n. 337, 2004