

# Técnicas moleculares aplicadas à microbiologia de alimentos

Eliezer Ávila Gandra\*, Tatiane Kuka Valente Gandra, Willians Sebastião de Mello e Huana da Silva Godoi

Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Universidade Estadual de Maringá, Campus Regional de Umuarama, Rod. PR 489, 1400, 87506-400, Umuarama, Paraná, Brasil. \*Autor para correspondência. E-mail: eagandra@uem.br

**RESUMO.** A partir da década de 80, as técnicas moleculares começaram a ser utilizadas como uma alternativa aos métodos fenotípicos, tradicionalmente, utilizados em microbiologia de alimentos. Foi acelerada esta substituição com advento da descoberta da reação em cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction* – PCR). Este artigo tem por objetivo revisar as principais técnicas moleculares utilizadas como ferramentas na microbiologia de alimentos, desde as, inicialmente, desenvolvidas, como a análise do perfil plasmidial, até as mais contemporâneas como o PCR em tempo real, discutindo as características, vantagens e desvantagens destas técnicas, avaliando a potencialidade destas para suprir as limitações das técnicas tradicionais.

**Palavras-chave:** REA, PFGE, ribotipagem, RAPD, RT-PCR, multiplex PCR.

**ABSTRACT. Molecular techniques applied to food microbiology.** Beginning in the 1980s, molecular techniques became an alternative to the traditionally used phenotypic methods in food microbiology. With the advent of the polymerase chain reaction technique, this substitution was speed up. This article had as objective to review the main molecular techniques used as tools in food microbiology, from plasmidial profile analysis to contemporary techniques such as the real-time PCR. The characteristics, advantages and disadvantages of these techniques are discussed, by evaluating the potential of these techniques to overcome the limitations of traditional techniques.

**Key words:** REA, PFGE, ribotyping, RAPD, RT-PCR, multiplex PCR.

## Introdução

As técnicas tradicionais de microbiologia de alimentos fundamentam-se na utilização de testes morfológicos e bioquímicos para tipagem, subtipagem e identificação de gêneros, espécies e subespécies microbianas. As técnicas microbiológicas mais comumente utilizadas são realizadas em meios de cultura não-seletivos e seletivos complementadas por testes bioquímicos diferenciais, na sua maioria, de produção enzimática, usados em conjunto com testes sorológicos.

Segundo Farber *et al.* (2001), os resultados de testes bioquímicos, utilizados para identificação e biotipagem bacteriana podem apresentar variabilidade pela ação de fatores ambientais sobre a expressão gênica, além de outras desvantagens, como o baixo poder discriminatório em microrganismos com pouca variabilidade genética e o risco de interpretações errôneas, quando se utiliza um número limitado de testes. Entretanto, a utilização de um número grande de determinações microbiológicas, torna o custo de análise muito elevado.

Marin *et al.* (2006) descrevem que os métodos

tradicionais de detecção de microrganismos em alimentos, embora confiáveis e eficientes, requerem de vários dias a semanas antes dos resultados serem obtidos. Os mesmos autores ressaltam que as propriedades fenotípicas pelas quais as bactérias são identificadas podem não ser expressas e quando são, podem ser difíceis de serem interpretadas e classificadas, além da possibilidade de existência de células viáveis, porém não-cultiváveis.

Nas últimas décadas, verificou-se aumento significativo no desenvolvimento de técnicas moleculares para a detecção, identificação e caracterização de bactérias patogênicas em alimentos. Avanços, nos estudos de biologia molecular, propiciaram o desenvolvimento e emprego de vários métodos de tipagem molecular (Destro, 1995).

Técnicas genotípicas referem-se à caracterização do DNA cromossômico, plasmidial ou total de um microrganismo, características estas relativamente estáveis (Destro, 1995).

As técnicas moleculares têm aplicação direta na detecção e caracterização de bactérias patogênicas em alimentos. Dentre essas, destacam-se as fundamentadas na amplificação de seqüências do

DNA pela reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction* - PCR) (Boer e Beumer, 1999; Malorny et al., 2003).

A reação, em cadeia da polimerase, é uma técnica altamente sensível, por meio da qual, pequenas quantidades de seqüências de DNA ou RNA específicas podem ser enzimaticamente amplificadas até que sejam obtidas milhões de cópias da seqüência alvo (Konemam et al., 2001).

Na última década, o PCR tornou-se a técnica genética mais utilizada em diagnóstico microbiológico (Boer e Beumer, 1999; Malorny et al., 2003). Mesmo com o aumento da utilização das técnicas moleculares, em estudos de microbiologia de alimentos, escassas são as publicações em português que relacionem estas técnicas com esta área.

Este trabalho tem como objetivo revisar e discutir as técnicas moleculares que podem ser utilizadas para detecção, identificação, tipagem e subtipagem de microrganismos de interesse em alimentos, verificando as principais características destas técnicas, assim como suas vantagens e desvantagens em relação às técnicas tradicionais utilizadas em microbiologia de alimentos.

### **Técnicas moleculares fundamentadas na extração e corte de ácidos nucléicos**

As primeiras técnicas moleculares, utilizadas há mais de duas décadas, são fundamentadas na extração e tratamento de ácidos nucléicos, dentre estas se podem destacar a análise do perfil plasmidial, a análise de DNA cromossômico após digestão por enzima de restrição (*Restriction endonuclease analysis* - REA), a ribotipagem (*Ribotyping*) e a eletroforese em gel de campo pulsante (*pulsed-field gel electrophoresis* - PFGE).

#### **Perfil plasmidial**

O perfil plasmidial foi a primeira técnica de biologia molecular aplicada à tipagem de cepas bacterianas (Aarestrup, 2004). Os plasmídeos são DNA's extracromossomais circulares que podem ser sintetizados ou excluídos dependendo da sua necessidade dentro da célula microbiana.

Os passos básicos da técnica são a extração seletiva do DNA plasmidial da célula microbiana, a digestão do plasmídeo com enzimas de restrição (enzimas que cortam DNA) e uma "corrida" em um gel suporte submetido a um campo elétrico gerado por uma fonte de tensão, denominada de eletroforese, em que, por meio do número e do tamanho de fragmentos plasmidiais obtidos, ocorre a separação no gel, formando perfis que serão visualizados por meio de ultra-radiografia ou sob luz

ultravioleta, sendo estes utilizados como marcadores para um gênero, espécie ou subespécie (Destro, 1995).

A análise do perfil plasmidial origina boas informações epidemiológicas, mas como os plasmídeos são elementos extracromossômicos, podem ser espontaneamente perdidos ou ganhos por uma linha hospedeira. Assim sendo, a análise do perfil plasmidial é mais eficiente em estudos restritos em termos de tempo e lugar (Maslow et al., 1993).

Segundo Destro (1995), a análise do perfil plasmidial parece ser de pouco valor para bactérias com baixa incidência de plasmídeos, como é o caso de *L. monocytogenes*. No Reino Unido, apenas 1,7% das linhagens de *L. monocytogenes* isoladas apresentam plasmídeos. Em outros países, essa incidência é mais elevada (Fistrovici e Collins-Thompson, 1990; Kolstad et al., 1992; Dykes et al., 1994).

A tipagem e subtipagem molecular de *S. aureus* foi realizada Baumgartner et al. (1984), utilizando a análise do perfil plasmidial. Wojciech et al. (2004) descrevem a utilização do perfil plasmidial para a tipagem de *Yersinia enterocolitica*.

#### **REA**

A análise de DNA cromossômico, após digestão por enzima de restrição (*restriction endonuclease analysis* - REA), tem sido usada há vários anos como ferramenta epidemiológica para estudo de surtos de doenças de origem viral ou bacteriana (Destro, 1995; Aarestrup, 2004). Os passos básicos desta técnica são semelhantes aos da análise do perfil plasmidial: extração de DNA, corte com enzimas e eletroforese.

Uma endonuclease de restrição corta enzimaticamente ("digere") o DNA em uma seqüência específica ("restrita") de reconhecimento de nucleotídeos. O número e o tamanho dos fragmentos gerados refletem a seqüência e a distribuição destes sítios de restrição (Maslow et al., 1993).

A análise do DNA genômico pode ser feita empregando-se endonucleases de restrição que clivam o DNA tanto em regiões encontradas freqüentemente, como naquelas infreqüentes. Quando endonucleases com alta freqüência de corte são empregadas, um grande número de fragmentos que variam entre 0,5 e 50 kb de comprimento é gerado. Estes fragmentos podem ser separados por tamanho, utilizando a eletroforese clássica em gel de agarose e seus padrões são determinados após coloração em gel de agarose com brometo de etídio e fotografia sob luz ultravioleta (Destro, 1995).

A maior limitação desta técnica está na dificuldade de interpretação visual dos perfis originados, pois são compostos por centenas de

bandas que podem estar sobrepostas ou podem não ser bem resolvidas. Para facilitar a comparação, podem-se transferir os fragmentos de restrição, já separados para uma membrana de nitrocelulose (*Southern Blot*) usando como sonda fragmentos de DNA marcados, que detectam seqüências homólogas às da sonda. REA já foi utilizado para tipagem de *Yersinia enterocolitica* (Wojciech *et al.*, 2004).

Estas sondas podem ser derivadas de genes específicos para fatores de virulência (Tenover, 1988) ou de genes que codificam para a produção de RNA ribossômico – RNAr (Grimont e Grimont, 1986). As sondas podem ainda ser seqüências aleatórias de DNA (Tompkins *et al.*, 1986). Quando a sonda empregada é um RNAr, o método é chamado ribotipagem (Destro, 1995).

### Ribotipagem

Nesta técnica, são utilizadas sondas derivadas de seqüências altamente conservadas dos genes que codificam o RNA ribossomal (RNAr) para tipificação de bactérias (Aarestrup, 2006; Rodríguez-Lázaro *et al.*, 2007), como por exemplo *Yersinia enterocolitica* (Wojciech *et al.*, 2004).

Novamente, são realizados os passos da extração de DNA, digestão com enzimas de restrição e a eletroforese. A ribotipagem está baseada na presença de três a cinco cópias dos genes ribossomais no DNA bacteriano. Estes genes contêm seqüências altamente conservadas dentro dos gêneros ou famílias bacterianas. Na ribotipagem, as seqüências dos genes 16S e 23S RNAr marcados são usados como sonda e cada fragmento do DNA contendo o gene ribossômico será destacado dos demais, originando menor número de bandas que podem ser mais facilmente comparadas (Destro, 1995).

Sistemas automatizados, como o RiboPrintm da DuPont<sup>®</sup>, executam este tipo de tipagem. Quando se emprega para a digestão do DNA endonucleases de baixa frequência de corte, são gerados de 5 a 25 fragmentos, com pesos moleculares, que variam ente 10 e 2000 kb. Estes fragmentos não podem ser separados com eletroforese clássica, sendo necessário o emprego da eletroforese em gel de campo pulsante (*pulsed-field gel electrophoresis* - PFGE) (Lai *et al.*, 1989; Maslow *et al.*, 1993).

### PFGE

PFGE tornou-se uma das técnicas mais utilizadas para análise epidemiológica da maioria das bactérias patogênicas (Aarestrup, 2006; Rodríguez-Lázaro *et al.*, 2007). Segundo Destro (1995), PFGE é um método derivado da eletroforese convencional do

DNA, em gel de agarose, sendo a principal diferença a mudança repetida da orientação do campo elétrico.

Esta mudança provoca o re-arranjo da estrutura conformacional da molécula, permitindo a sua migração no gel. Esta movimentação obedece ao seguinte princípio: quando um campo elétrico é aplicado ao gel, as moléculas de DNA se alongam na direção do campo e migram no gel. Quando o primeiro campo é removido e um segundo é aplicado em relação ao primeiro, a molécula de DNA deve mudar sua conformação e re-orientação antes que ela possa migrar na direção do segundo campo elétrico (Lai *et al.*, 1989).

O tempo necessário para que essa re-orientação ocorra é proporcional ao peso molecular do fragmento, sendo a re-orientação das moléculas maiores mais demoradas que a das moléculas menores (Lai *et al.*, 1989). Diversos são os equipamentos existentes, no mercado, que empregam o campo pulsante, sendo que eles apresentam variações na geometria do campo elétrico (Destro, 1995).

A técnica empregada para a digestão do DNA por enzima de baixa frequência de corte é diferente daquela empregada para REA. Na técnica convencional, inicialmente faz-se a digestão enzimática da parede celular e/ou membranas, e de proteína celular, pelo em prego de proteinase K, na presença de detergente e EDTA (para inibir a atividade de nucleases endógenas). As moléculas de DNA preparadas por este método têm, em geral, menos de 50 kb por causa das quebras mecânicas.

Para evitar essas quebras e obter DNA íntegro para a digestão por enzima de baixa frequência de corte, as células são aprisionadas em agarose, antes da lise. A agarose mantém as moléculas de DNA intactas e ao mesmo tempo permite a difusão de detergente e protease. O DNA de alto peso molecular pode então ser submetido à digestão pela endonuclease de restrição (Lai *et al.*, 1989).

PFGE tem sido empregado para a caracterização de diversos microrganismos (Allardet-Servent *et al.*, 1989; Arbeit *et al.*, 1990; Soldati e Piffaretti, 1991; Harsono *et al.*, 1993; Powell *et al.*, 1994; Destro, 1995; Donabedian *et al.*, 1995; Wojciech *et al.*, 2004).

### Técnicas moleculares fundamentadas na reação em cadeia da polimerase – PCR

A reação em cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction* – PCR) é uma técnica altamente sensível, por meio da qual, são obtidas milhões de cópias de seqüências de ácidos nucléicos, por meio de uma reação enzimática, partir de diminutas quantidades de seqüências de DNA ou de RNA

específicas. Desenvolvida primeiramente por Kary B. Mullis em 1985, esta técnica permite obter milhões de cópias de um segmento específico de DNA por meio da ação da enzima Taq DNA polimerase e de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) sobre um DNA molde. É realizada em um equipamento automatizado e computadorizado, denominado termociclador, que promove a alternância de temperaturas por determinados períodos de tempo, possibilitando a ocorrência de ciclos repetitivos de desnaturação e síntese do DNA (Konemam et al., 2001).

A introdução da PCR, em diagnóstico microbiano, estabeleceu uma alternativa viável aos métodos tradicionais de cultura (Marlony et al., 2003). Esta técnica apresenta diversas vantagens em relação aos métodos convencionais, como maior poder de tipificação e discriminação, maior rapidez, bom limite de detecção, maior seletividade, especificidade, potencial para automação e a possibilidade de trabalhar com bactérias que não são cultiváveis em meios de cultura normalmente utilizados (Bush e Nitschko, 1999).

Os principais obstáculos à sua implementação na rotina laboratorial são a incapacidade do método em diferenciar entre células vivas e mortas, a presença de inibidores de enzima polimerase em alguns alimentos, o alto investimento em equipamentos e reagentes e a falta de aprovação, padronização e regulamentação por parte dos órgãos oficiais (Marlony et al., 2003). Uma outra desvantagem está na complexidade do método, principalmente para ser utilizado em análises de rotina, apesar de que o recente desenvolvimento de kits básicos em PCR tem facilitado a sua utilização e difusão (Boer e Beumer, 1999).

Outros fatores podem influenciar a eficiência do PCR, cabendo ressaltar entre eles a concentração de íons de magnésio, a temperatura de cada ciclo, duração de cada uma das etapas de um ciclo, números de ciclos, concentração dos dNTPs e a concentração da polimerase. Contaminantes presentes na amostra também podem inibir a reação (Clarke et al., 1992) e enzimas termoestáveis produzidas por microrganismos podem degradar os produtos da amplificação (Nakajima et al., 1994; Destro, 1995).

A descrição da reação em cadeia da polimerase-PCR (Mullis e Faloona, 1987) possibilitou um grande avanço nas técnicas de biologia molecular. Esta reação tem se transformado nas últimas décadas em um instrumento de pesquisa altamente especializado e em uma técnica aplicada em diversos laboratórios. Áreas como microbiologia, imunologia,

oncologia, genética, medicina forense, transplantes de órgãos, entre outras, foram beneficiadas pela PCR (Destro, 1995).

Diversos pesquisadores têm descrito a utilização de técnicas fundamentadas em PCR na detecção direta de microrganismos em alimentos (Rossen et al., 1991; Jensen et al., 1994; Destro, 1995; Gandra, 2006). Da maneira como foi originalmente descrita, PCR fornecia resultados positivos ou negativos. Para torná-la um sistema de tipagem epidemiológica, diversas variações têm sido desenvolvidas, uma destas variações originou uma técnica conhecida como RAPD – *Random amplified polymorphic DNA* (DNA polimórfico aleatoriamente amplificado) (Destro, 1995).

Segundo Rodríguez-Lázaro et al. (2007), PCR será utilizado como um procedimento de rotina comum em laboratórios de análise dentro dos próximos dez anos.

#### RAPD

RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) ou AP-PCR (*Arbitrarily Primed PCR*), foram descritas, originalmente, por Welsh e McClelland em 1990, e envolvem o uso de um *primer* único e pequeno (usualmente de 10 a 15 bases), arbitrariamente escolhido, para amplificar DNA genômico em condições de baixa estrigência, não sendo necessário o conhecimento prévio da região de ligação do *primer* (Welsh e McClelland, 1990; Williams et al., 1990; Tang e Persing, 1999).

Quando submetidos à PCR, estes iniciadores arbitrários resultarão na amplificação de uma ou mais seqüências de DNA, gerando conjuntos de fragmentos que funcionam como marcadores genéticos. O número e o tamanho destes fragmentos são à base de tipagem de um isolado bacteriano (Destro, 1995).

A principal vantagem do RAPD sobre o PCR tradicional é a possibilidade de detectar polimorfismos do DNA sem a necessidade de conhecimento prévio da seqüência de nucleotídeos de um gene relevante ou do DNA alvo. Entretanto, a escolha dos iniciadores que originem resultados reprodutíveis é um pouco trabalhosa, exigindo muitas vezes o teste de dezenas deles (Maslow et al., 1993). Diversos trabalhos de tipagem e subtipagem molecular de *Yersinia enterocolitica* (Wojciech et al., 2004) e de *S. aureus* (Matthews et al., 1994; Fitzgerald et al., 1997; Silva, 1998) têm sido desenvolvidos, analisando o polimorfismo de fragmentos amplificados aleatoriamente (RAPD-PCR).

### RT-PCR

Várias modificações da técnica de PCR básica foram descritas (Konemam *et al.*, 2001), uma dessas modificações é a RT-PCR (*Reverse Transcriptase PCR*), desenvolvida para amplificar DNA obtido por meio da transcrição reversa de RNA. Para isto, primeiramente, o RNA é convertido em DNA complementar (DNAC) pela ação da enzima transcriptase reversa (RT) e o DNAC é amplificado por PCR (Tang e Persing, 1999).

Esta técnica pode ser utilizada na análise de expressão de genes (de virulência e/ou produção de toxinas) em alimentos, possui ampla aplicação para o estudo de RNA viral (Tang e Persing, 1999), sendo utilizado para detecção de nonovírus em alimentos (Marin *et al.*, 2006).

### Nested PCR

O *Nested PCR* é uma técnica na qual são realizados diversos ciclos de amplificação com um grupo de *primers* e o produto dessa amplificação é, então, re-amplificado, utilizando-se outro grupo de *primers* dirigidos para uma seqüência que se encontra dentro da seqüência amplificada pelo primeiro grupo de *primers*. Atualmente, raros são os estudos realizados utilizando esta técnica na microbiologia de alimentos (Konemam *et al.*, 2001).

### Multiplex PCR

Outra técnica molecular de interesse para o diagnóstico de microrganismos de importância em alimentos é o multiplex PCR (mPCR), que utiliza mais de um par de *primers* na mesma reação, possibilitando a amplificação simultânea de diferentes seqüências de DNA (Tang e Persing, 1999). Esta técnica pode ser utilizada para amplificar, de modo simultâneo, seqüências alvo de diferentes microrganismos patogênicos em uma única reação, tendo potencial para ser utilizada na rotina laboratorial (Tang e Persing, 1999; Konemam *et al.*, 2001).

Segundo Perry *et al.* (2007), as vantagens do mPCR, na detecção de patógenos alimentares, em relação a uma reação PCR para apenas uma seqüência alvo de um microrganismo (“*uniplex*” PCR ou uPCR), estão na diminuição da intensidade e do período de trabalho laboratorial, na redução do número de reagentes e por conseqüência, na redução dos custos, a todos estes fatores associados ao que seria requerido para um teste de detecção de cada microrganismo separadamente.

Para os mesmos autores, as desvantagens desta técnica em relação ao uPCR estão associadas à redução da sensibilidade de detecção, muitas vezes

não sendo detectada uma seqüência alvo, a necessidade de uma grande concentração inicial das seqüências alvo e a presença de polimorfismos, estes fatores estão associados à competição entre os *primers* pelas seqüências alvo e pelos reagentes presentes. Por isso, em pesquisas utilizando mPCR é necessário que se façam ensaios preliminares de otimização da reação, a fim de estabelecer o programa de PCR ideal e a concentração de reagentes e da seqüência alvo mais adequada, de forma a amplificar todas seqüências alvo de maneira similar eliminando produtos de amplificação inespecíficos.

Desde a sua primeira descrição, em 1988, esta técnica tem sido utilizada com sucesso em diversos estudos moleculares, incluindo análises de deleção, mutação e polimorfismos ou em estudos quantitativos com RT – PCR (Gandra, 2006).

Ensaio com mPCR têm sido desenvolvidos para detecção simultânea de *Salmonella* spp., *L. monocytogenes* e *E. coli* O157:H7 em carne de porco, verificando um limite de detecção de uma unidade formadora de colônia por grama de carne (1 UFC g<sup>-1</sup>) (Perry *et al.*, 2007).

Experimentos delineados para a detecção e identificação de *S. aureus* presente em leite e derivados, utilizando mPCR, foram encontrados na literatura consultada. Como exemplo, podemos citar as pesquisas de Tamarapu *et al.* (2001), que desenvolveram um mPCR para detecção de cepas de *S. aureus* diretamente em leite bovino e em queijo cheddar, por meio da amplificação de seqüências do gene *nuc* e do gene *entC*.

Em outro trabalho relatado por Baron *et al.* (2004), foram utilizadas seqüências espécies-específicas do gene *nuc* em um mPCR para discriminar *S. aureus* de *S. intermedius* de variadas origens e Gandra (2006) utilizou um mPCR com seqüências do gene *nuc* para identificação de *S. aureus*, *S. hyicus* e *S. intermedius* diretamente em leite bovino artificialmente contaminado.

### REP, ERIC, BOX

O aprimoramento de metodologias baseadas em PCR possibilitou a inserção destas técnicas para a identificação e tipificação de microrganismos e, dependendo da especificidade de detecção desejada (gênero, espécie, subespécie), podem ser utilizadas em diferentes regiões do genoma (Boer e Beumer, 1999; Marlony *et al.*, 2003).

Famílias de elementos repetitivos intergênicos têm sido descritas em diversas espécies bacterianas (Gillings e Holley, 1997). Estes elementos são seqüências genômicas conhecidas, conservadas,

repetitivas e de consenso, denominadas de REP (*Repetitive Extragenic Palindromic*), ERIC (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus*) e seqüências repetitivas conservadas denominadas simplesmente de BOX (Farber et al., 2001).

Primers para estas seqüências são chamados de primers “de consenso” têm sido desenhados e utilizados para amplificar regiões entre estes elementos repetitivos por meio de PCR, gerando perfis específicos (*fingerprinting*) que podem ser utilizados para tipagem e identificação de espécies bacterianas, sendo estas técnicas denominadas de REP-PCR, ERIC-PCR e BOX-PCR (Gillings e Holley, 1997). Vinte e cinco cepas de *Yersinia enterocolitica*, isoladas de humanos, porcos e raposas foram analisadas com sucesso por genotipagem por meio de REP-PCR e ERIC-PCR revelando a presença de sete diferentes genótipos (Wojciech et al., 2004).

Gillings e Holley (1997) avaliaram a especificidade de perfis gerados com ERIC-PCR para várias espécies bacterianas, para bacteriófagos, fungos, invertebrados, plantas e vertebrados e verificaram perfis muito complexos para estes organismos. Os mesmos autores sugerem que a amplificação de fragmentos ERIC-PCR é extremamente influenciada pelas condições de reação, principalmente pela temperatura de ligação dos primers, podendo muitas vezes levar a amplificação de seqüências inespecíficas, não sendo necessariamente seqüências ERIC ou REP.

#### RFLP-PCR

Outra técnica muito usada é a análise do polimorfismo do tamanho de fragmento de restrição, previamente amplificados por PCR (*Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism*, PCR-RFLP), na qual fragmentos amplificados por PCR são submetidos à digestão com uma (ou mais) endonuclease de restrição específica, seguida de eletroforese em gel de agarose para a verificação do polimorfismo (Farber et al., 2001).

Esta técnica foi desenvolvida com eficácia por Shangkuan et al. (2000) para análise da diversidade genômica de 21 cepas de *Bacillus anthracis* e de 28 cepas de *Bacillus cereus*. Estes autores concluíram que esta técnica é de simples execução e tem potencial para ser utilizada como um método rápido para tipagem e discriminação de *B. anthracis* e de *B. cereus* de outras bactérias do mesmo gênero.

PCR-RFLP foi utilizada para o estudo de regiões variáveis do gene da coagulase (*coa*) de *S. aureus*, por meio de clivagem com a enzima de restrição *AluI*

(Goh et al., 1992; Sachwarzkopf e Karch, 1994; Aarestrup et al., 1995; Hookey et al., 1998; Motta et al., 2001).

Nos últimos anos, o uso de PCR-RFLP vem sendo associado à eletroforese em campo pulsante (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*, PFGE) (Farber et al., 2001; Konemam et al., 2001; Tang e Persing, 1999).

#### PCR ribotipagem

Farber et al. (2001) descrevem, também, outra técnica de identificação e tipificação bacteriana, denominada de PCR ribotipagem (PCR *Ribotyping*), que envolve a amplificação por PCR da região entre as seqüências conservadas 5S, 16S e 23S do operon do RNA ribossômico (RNAr), que está sendo muito utilizada para a diferenciação entre espécies microbianas.

Nesta técnica, também se pode realizar a digestão dos fragmentos amplificados com uma enzima de restrição, realizar a corrida eletroforética, transferir os fragmentos desnaturados para um filtro, hibridizar com uma sonda marcada e revelar os padrões de bandas.

Shangkuan et al. (2000) consideram a comparação de seqüências genéticas do RNAr de elevada consistência em estudos taxonômicos. Estes descrevem que a região 16S do RNAr de *B. mycoides* e de *B. thuringiensis* diferem significativamente da mesma região em *B. anthracis* e de *B. cereus*, sendo estas diferenças de zero a nove nucleotídios, indicando o potencial destes genes para serem utilizados em testes de diferenciação bacteriana.

A região entre 16S e 23S do operon do RNAr foi utilizada com sucesso para identificação de *S. aureus* por PCR ribotipagem (Gürtler e Barrie, 1995; Cuny et al., 1996).

#### PCR em tempo real

Uma limitação da reação PCR tradicional está na característica qualitativa desta técnica, limitando-a para estudos quantitativos. Em função disso, desenvolveu-se uma nova metodologia denominada de PCR em tempo real (*Real Time PCR*). Esta metodologia refere-se à utilização de processos químicos automatizados de monitoramento do acúmulo de produtos de PCR em uma reação, em tempo real, utilizando sondas químicas fluorescentes (Glynn et al., 2006).

O PCR, em tempo real, possui sistema tubular para detectar o acúmulo de produtos de PCR, composto de um termociclador com câmeras detectoras refrigeradas para detecção de luz fluorescente, em que a ressonância emitida é diretamente proporcional à intensidade de

fluorescência e por sua vez ao número de amplicons produzidos, gerando uma curva-padrão, associando a ressonância emitida com os produtos amplificados. Possui ainda sistema informatizado com software que realiza a separação, quantificação e interpretação do espectro gerado, realizando assim a distinção e quantificação de mais de um fluoróforo, que por sua vez permite a detecção de mais de um DNA alvo (Bustin, 2000; Bustin, 2002).

Atualmente, as sondas utilizadas na PCR, em tempo real, variam em função do fabricante e da tecnologia aplicada; as mais utilizadas são as sondas *TaqMan* (5' exonuclease) probes, *fluorescent resonance energy transfer* (FRET) probe, *molecular beacons* e *scorpion probes*, sendo que cada tipo de sonda promove a detecção dos fragmentos amplificados de forma diferente (Glynn *et al.*, 2006).

Duas tecnologias de PCR, em tempo real, destacam-se atualmente, a *SYBR Green Real-Time PCR* e a *5'-Nuclease Real-time PCR*. Na primeira tecnologia, são utilizados nucleotídeos ligados a sondas *SYBR Green* para quantificar produtos de PCR. A segunda está fundamentada na atividade 5'-3' exonucleolítica da enzima TaqDNAPolimerase, em que a mistura de reação é composta por sondas fluorogênicas formadas pela associação de um oligonucleotídeo com um fluoróforo e um elemento que emite ressonância denominado de "quencher" (Perry *et al.*, 2007).

Segundo Rodríguez-Lázaro *et al.* (2007), a PCR, em tempo real, possibilita o monitoramento da síntese de produtos de amplificação no decorrer da própria reação de síntese PCR e não apenas no final da reação como ocorre na PCR tradicional. Para os mesmos autores, as principais vantagens estão na possibilidade de execução de estudos quantitativos e não apenas qualitativos e na eliminação do risco de contaminação, pois esta reação ocorre em um sistema tubular fechado, não havendo também a necessidade de eletroforese para visualização das amplificações.

#### **Comparação entre as técnicas fenotípicas e genotípicas aplicadas a microbiologia de alimentos**

Comparando-se técnicas microbiológicas tradicionalmente utilizadas (fenotípicas) e as técnicas moleculares expostas neste estudo, pode-se inferir que depois de estabelecida a estrutura laboratorial para ambas as técnicas, o tempo de análise requerido é menor para a baseada em características genotípicas, principalmente quando se utiliza PCR.

Com as técnicas baseadas em PCR, podem-se obter resultados em 24 horas, no entanto, recentes estudos têm proposto a execução da extração de

DNA por meio de ação química, associada à lise por aquecimento, possibilitando que análises baseadas em PCR sejam realizadas em um período de 6 a 8 horas (Tamarapu *et al.*, 2001).

Já, as técnicas fenotípicas, comumente utilizadas, demandam tempo maior de análise e, na maioria dos casos, são necessários vários testes para uma identificação em nível de espécie. Por exemplo, só para a caracterização de uma cepa como *Estafilococos coagulase positiva*, sem a diferenciação em nível de espécie, realiza-se crescimento em ágar diferencial seletivo (Baird-Parker) seguido dos testes da coagulase livre e da produção de termonuclease, demandando um tempo mínimo de 72 horas para se obter o resultado (Gandra, 2006).

Um problema que pode levar a interpretações errôneas, em análises de microrganismos em alimentos por técnicas moleculares, é a ocorrência de resultados falso-positivos decorrentes de amplificações geradas a partir de células mortas. Segundo Glynn *et al.* (2006), este problema pode ser resolvido com a adição de um passo inicial de enriquecimento da cultura antes do PCR. Alternativamente, a detecção e amplificação *in vitro* de RNA também servirão para indicar a viabilidade dos microrganismos presentes, apesar do isolamento deste ácido nucléico ser mais difícil do que de DNA, principalmente pela natureza facilmente degradável do RNA.

Outros aspectos que devem ser levados, em consideração para otimização e aprimoramento das técnicas moleculares, são a preparação de amostras, a inclusão de um controle interno da amplificação e a purificação do DNA e RNA.

Os propósitos da preparação de amostras para técnicas moleculares são: homogeneizar a mesma, aumentar a concentração do organismo alvo e reduzir ou excluir substâncias inibitórias da amplificação. Como a maioria das amostras de alimentos varia em homogeneidade, consistência, composição e microbiota acompanhante, procedimentos de pré-amplificações devem ser adaptados para cada matriz alimentícia (Rodríguez-Lázaro *et al.*, 2007).

Estratégias para minimizar o impacto de inibidores de PCR na análise por PCR de amostras de alimentos incluem o enriquecimento e separação dos microrganismos dos demais componentes do alimento, a purificação do DNA de bactérias que sofreram lise e o uso de aditivos de PCR com o intuito de seqüestrar ou inativar os inibidores de PCR e a re-amplificação de produtos de PCR não-detectados (Perry *et al.*, 2007).

Glynn *et al.* (2006) sugerem outras metodologias

para preparação de amostras para separação de substâncias inibitórias do PCR como filtração, centrifugação, uso de detergentes e solventes orgânicos, tratamento com enzimas, inclusão de aditivos de PCR e diluição da amostra antes do PCR.

A inclusão de um controle interno da amplificação (IAC - *Internal Amplification Control*) é de extrema importância para detecção de inibição da reação PCR (Rampersad et al., 2005). Um IAC é uma seqüência que não é o alvo da amplificação, mas que pode ser amplificada por um par de *primers* utilizado em um mPCR (Perry et al., 2007).

Segundo Rodríguez-Lázaro et al. (2007), um IAC é uma seqüência de ácido nucléico que é amplificada simultaneamente com a seqüência alvo. Em uma reação sem um IAC, uma resposta negativa gera um resultado dúbio, pois pode significar a seqüência alvo não estava presente na reação ou que a reação foi inibida. Em uma reação com a presença do IAC, uma amplificação controle sempre será produzida, mesmo quando a seqüência alvo não esteja presente, indicando claramente que não ocorreu inibição da reação.

A melhoria da etapa de extração do DNA e/ou RNA possibilita a obtenção de ácidos nucléicos com maior pureza o que por sua vez possibilitaria que, utilizando as técnicas moleculares já descritas, sejam obtidos limites de detecção mais efetivos.

Deve-se levar em consideração, ainda, que na maioria dos testes fenotípicos pode ocorrer variabilidade de resultados, com a ocorrência de resultados falso-negativos, reflexo da ação de fatores ambientais sobre a expressão gênica, conforme descrevem Farber et al. (2001) e Marin et al. (2006). Estes autores relatam que, os principais limitantes para as técnicas fundamentadas em PCR, é o alto custo inicial e a falta de uma legislação que padronize e valide estas técnicas.

Os mesmos autores ressaltam que uma iniciativa para resolver estes limitantes foi tomada pela União Européia, a partir de 1999, quando se iniciou o projeto "Food-PCR", que está validando a PCR para detecção de *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Escherichia coli* enterohemorrágica, *Listeria monocytogenes* e *Yersinia enterocolitica*, envolvendo 35 laboratórios em 21 países.

Além da possível padronização futura destas técnicas, avanços nas tecnologias de amplificação *in vitro*, em particular na PCR em tempo real, juntamente com o desenvolvimento de sistemas automáticos de extração e purificação de ácidos nucléicos e de *kits* para detecção molecular de patógenos alimentares, estão tornando as técnicas moleculares cada vez mais acessíveis para os usuários

(Glynn et al., 2006).

## Conclusão

As técnicas tradicionais de cultura de microrganismos continuarão ainda, por algum tempo, ocupando a sua posição como métodos analíticos oficiais para determinação da sanidade de alimentos, principalmente no Brasil, mas em um futuro próximo, as técnicas moleculares estarão presentes em todos os laboratórios de análises, complementando e sendo alternativas viáveis as técnicas tradicionais para o controle de microrganismos em alimentos e em processos alimentícios.

## Referências

- AARESTRUP, F.M. Monitoring of antimicrobial resistance among food animals: principles and limitations. *J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health*, Oxford, v. 51, p. 380-388, 2004.
- AARESTRUP, F.M. *Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin*. Washington, D.C.: ASM Press, 2006.
- AARESTRUP, F.M. et al. Evaluation of phenotypic and genotypic methods for epidemiological typing of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis in Denmark. *Veterinary Microbiol.*, Amsterdam, v. 45, p. 139-150, 1995.
- ALLARDET-SERVENT, A. et al. Use of low-frequency-cleavage restriction endonucleases for DNA analysis in epidemiological investigations of nosocomial bacterial infections. *J. Clin. Microbiol.*, Washington, D.C., v. 27, n. 9, p. 2057-2061, 1989.
- ARBEIT, R.D. et al. Resolution or recent evolutionary divergence among *Escherichia coli* from related lineages: the application of pulsed field electrophoresis to molecular epidemiology. *J. Infect. Dis.*, Chicago, v. 1, n. 61, p. 230-235, 1990.
- BARON, F. et al. Development of a PCR test to differentiate between *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus intermedius*. *J. Food Prot.*, Des Moines, v. 67, p. 2302-2305, 2004.
- BAUMGARTNER, A. et al. Plasmid profiles of *Staphylococcus aureus* causing bovine mastitis. *J. Appl. Bacteriol.*, Washington, D.C., v. 56, p. 159-163, 1984.
- BOER, E.; BEUMER, R.R. Methodology for detection and typing of foodborne microorganisms. *Int. J. Food Microbiol.*, Amsterdam, v. 50, p. 119-130, 1999.
- BUSH, U.; NITSCHKO, H. Methods for the differentiation of microorganisms. *J. Chromatography*, Amsterdam, v. 722, p. 263-278, 1999.
- BUSTIN, S.A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J. Mol. Endocrinol.*, Bradley Stoke, v. 25, p. 169-193, 2000.
- BUSTIN, S.A. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J. Mol. Endocrinol.*, Bradley Stoke, v. 29, p. 23-39, 2002.

- CLARKE, A.M.T. *et al.* Molecular biology made easy: the polymerase chain reaction. *Histochem. J.*, London, v. 24, p. 913-916, 1992.
- CUNY, C. *et al.* Discrimination of *S. aureus* strains by PCR for rRNA gene spacer size polymorphism and comparison to SmaI macrorestriction patterns. *Zbl. Bakt.*, London, v. 283, p. 466-476, 1996.
- DESTRO, M.T. *Listeria monocytogenes* em camarão (*Penaeus brasiliensis*): marcadores sorológicos e genéticos no monitoramento de sua disseminação em uma unidade processadora de pescado. 1995. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos)–Universidade de São Paulo, São Paulo, 1995.
- DONABEDIAN, S. *et al.* DNA hybridization and contour-clamped homogeneous electric field electrophoresis for identification of enterococci to the species level. *J. Clin. Microbiol.*, Washington, D.C., v. 33, n. 1, p. 141-145, 1995.
- DYKES, G.A. *et al.* Plasmid profiles of *Listeria* species associated with poultry processing. *Food Microbiol.*, London, v. 22, n. 6, p. 519-523, 1994.
- FARBER, J.M. *et al.* Molecular typing and differentiation. In: FARBER, J.M. *et al.* (Ed.). *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. Washington, D.C.: APHA, 2001. cap. 11, p. 127-158.
- FISTROVICI, E.; COLLINS-THOMPSON, D.L. Use of plasmid profiles and restriction endonuclease digest in environmental studies of *Listeria* spp. from raw milk. *Int. J. Food Microbiol.*, Amsterdam, v. 10, p. 43-50, 1990.
- FITZGERALD, J.R. *et al.* Fine-structure molecule epidemiological analysis of *Staphylococcus aureus* recovered from cows. *Epidemiol. Infect.*, Cambridge, v. 119, p. 261-269, 1997.
- GANDRA, E.A. *Multiplex PCR para detecção de S. aureus, S. intermedius e S. hyicus em leite UHT artificialmente contaminado*. 2006. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial)–Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2006.
- GILLINGS, M.; HOLLEY, M. Repetitive element PCR fingerprinting (rep-PCR) using enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) primers is not necessarily directed at ERIC elements. *Letters Appl. Microbiol.*, Bedford, v. 25, p. 17-21, 1997.
- GLYNN, B. *et al.* Current and emerging molecular diagnostic technologies applicable to bacterial food safety. *Int. J. Dairy Tech.*, Long Hanborough, v. 59, n. 2, p. 126-139, 2006.
- GOH, S.H. *et al.* A molecular typing of *Staphylococcus aureus* on the basis of coagulase gene polymorphism. *J. Clin. Microbiol.*, Washington, D.C., v. 30, n. 7, p. 1642-1645, 1992.
- GRIMONT, F.; GRIMONT, P.A.D. Ribosomal ribonucleic acid gene restriction pattern as potential taxonomic tools. *Ann. Inst. Pasteur/Microbiol.*, Paris, v. 137B, p. 165-175, 1986.
- GÜRTLER, V.; BARRIE, H.D. Typing of *Staphylococcus aureus* strains by PCR amplification of variable length 16S-23S rDNA spacer regions: characterization of spacer sequences. *Microbiology*, Reading, v. 141, p. 1255-1265, 1995.
- HARSONO, K.D. *et al.* Comparison and genomic sizing of *Escherichia coli* O157:H7 isolates by pulsed-field gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.*, Washington, D.C., v. 59, n. 9, p. 3141-3144, 1993.
- HOOKEY, J.V. *et al.* Molecular typing of *Staphylococcus aureus* based on PCR restriction fragment length polymorphism sequence analysis of the coagulase gene. *J. Clin. Microbiol.*, Washington, D.C., v. 36, p. 1083-1089, 1998.
- JENSEN, M.A. *et al.* The application of a PCR-based assay for the detection of Salmonella. In: GENERAL MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY. 94., 1994, Las Vegas. *Abstracts...* Las Vegas: ASM, 1994. p. 369. abstr. p-2.
- KOLSTAD, J. *et al.* Differentiation of *Listeria monocytogenes* isolates by using plasmid profiling and multilocus enzyme electrophoresis. *Int. J. Food Microbiol.*, Amsterdam, v. 16, n. 3, p. 247-260, 1992.
- KONEMAM, E.W. *et al.* *Diagnóstico microbiológico*. São Paulo: Medsi, 2001.
- LAI, E. *et al.* Pulsed fields electrophoresis. *Biotechniques*, Natick, v. 7, n. 1, p. 34-42, 1989.
- MALORNY, B. *et al.* Standardization of diagnostic PCR for detection of foodborne pathogens. *Int. J. Food Microbiol.*, Amsterdam, v. 83, n. 1, p. 39-48, 2003.
- MARIN, V.A. *et al.* Detecção de patógenos presentes nos alimentos: A falta de padronização e validação de métodos moleculares no Brasil. *Higiene Alimentar*, São Paulo, v. 20, n. 145, p. 46-50, 2006.
- MASLOW, J.N. *et al.* Molecular epidemiology: application of contemporary techniques to the typing of microorganisms. *Clin. Infect. Dis.*, New York, v. 17, p. 1543-1564, 1993.
- MATTHEWS, K.R. *et al.* Genomic fingerprints of *Staphylococcus aureus* of bovine origin by polymerase chain reaction-based DNA fingerprinting. *Epidemiol. Infect.*, Cambridge, v. 112, p. 177-186, 1994.
- MOTTA, O.V. *et al.* Detection of different *Staphylococcus aureus* strains in bovine milk from subclinical mastitis using PCR and routine techniques. *Brazilian J. Microbiol.*, São Paulo, v. 31, p. 32-37, 2001.
- MULLIS, K.B.; FALOONA, F.A. Specific synthesis of DNA in vitro via polymerase-catalyzed chain reaction. *Method. Enzymol.*, New York, v. 155, p. 335-350, 1987.
- NAKAJIMA, H. *et al.* Degradation of polymerase chain reaction (PCR) product by heat-stable desoxyribonuclease (Dnase) produced from *Yersinia enterocolitica*. *Microbiol. Immunol.*, Tokyo, v. 38, n. 2, p. 153-156, 1994.
- PERRY, L. *et al.* Application of multiplex polymerase chain reaction to the detection of pathogens in food. *J. Rapid Meth. Autom. Microbiol.*, Washington, D.C., v. 15, p. 176-198, 2007.
- POWELL, N.G. *et al.* Subdivision of *Salmonella enteritidis* PT4 by pulsed-field gel electrophoresis: potential for epidemiological surveillance. *Microbiol. Lett.*, Amsterdam, v. 119, p. 193-198, 1994.
- RAMPERSAD, J.N. *et al.* A nested-PCR with an internal amplification control for the detection and differentiation

- of *Bartonella henselae* and *B. clarridgeiae*: an examination of cats in Trinidad. *BMC Infect. Dis.*, London, v. 5, n. 63, p. 1471-2334, 2005.
- RODRÍGUEZ-LÁZARO, D. et al. Trends in analytical methodology in food safety and quality: monitoring microorganisms and genetically modified organisms. *Trends Food Sci. Tech.*, Amsterdam, v. 18, p. 306-319, 2007.
- ROSSEN, L. et al. A rapid polymerase chain reaction (PCR)-based assay for the identification of *Listeria monocytogenes* in foods sample. *Int. J. Food Microbiol.*, Amsterdam, v. 14, p. 145-151, 1991.
- SACHWARZKOPF, A.; KARCH, H. Genetic variation in *Staphylococcus aureus* coagulase genes: potential and limits for use as epidemiological marker. *J. Clin. Microbiol.*, Washington, D.C., v. 32, p. 2407-2412, 1994.
- SHANGKUAN, Y.H. et al. Comparison of PCR-RFLP, ribotyping and ERIC-PCR for typing *Bacillus anthracis* and *Bacillus cereus* strains. *J. Appl. Microbiol.*, Washington, D.C., v. 89, p. 452-462, 2000.
- SILVA, W.P. *Caracterização fenotípica e genotípica de Staphylococcus aureus isoladas de leite de vaca com mastite subclínica e de outras em propriedades produtoras de leite*. 1998. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos)– Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.
- SOLDATI, L.; PIFFARETTI, J.C. Molecular typing of *Shigella* strains using pulsed field gel electrophoresis and genome hybridization with insertion sequences. *Res. Microbiol.*, Paris, v. 142, p. 489-498, 1991.
- TAMARAPU, S. et al. Development of a multiplex polymerase chain reaction assay for detection and differentiation of *Staphylococcus aureus* in dairy products. *J. Food Prot.*, Des Moines, v. 64, n. 5, p. 664-668, 2001.
- TANG, Y.; PERSING, D. Molecular detection and identification of microorganisms. In: MURRAY, P.R. et al. (Ed.). *Manual of clinical microbiology*. Washington, D.C.: ASM, 1999. cap. 13, p. 215-244.
- TENOVER, F.C. Diagnostic deoxyribonucleic acid probes for infectious diseases. *Clin. Microbiol. Rev.*, Washington, D.C., v. 1, p. 82-101, 1988.
- TOMPKINS, L.S. et al. Cloned, random chromosomal sequences as probes to identify *Salmonella* species. *J. Infect. Dis.*, Chicago, v. 154, p. 156-162, 1986.
- WELSH, J.; McCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.*, London, v. 18, n. 24, p. 7213-7218, 1990.
- WILLIAMS, J.G.K. et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetics markers. *Nucleic Acids Res.*, London, v. 18, n. 22, p. 6531-6535, 1990.
- WOJCIECH, L. et al. Typing of *Yersinia enterocolitica* isolates by ITS profiling, REP and ERIC-PCR. *J. Vet. Med.*, Berlin, v. 51, n. 5, p. 238-244, 2004.

Received on February 28, 2007.

Accepted on August 24, 2007.