



Métodos moleculares aplicados à microbiologia de alimentos

Hans Fröder

XII Workshop em Alimentos
Lajeado/RS, 5 a 6 de outubro 2011

Tendência Mundial

- Qualidade e Inocuidade dos Alimentos:
 - Monitoramento dos Riscos
 - Análise FQ
 - Análise Microscópica
 - Análise Microbiológica



Qualidade dos Alimentos

- Verificada pelos MO Indicadores:
 - Bactérias aeróbias mesófilas, psicrotróficas e termófilas
 - *S. aureus* – homem → veiculador
 - Fungos → limpeza do local
 - Contaminação fecal (coliformes T,TT, *E. coli*)
 - *Enterobacteriaceae* (preferência)



Inocuidade

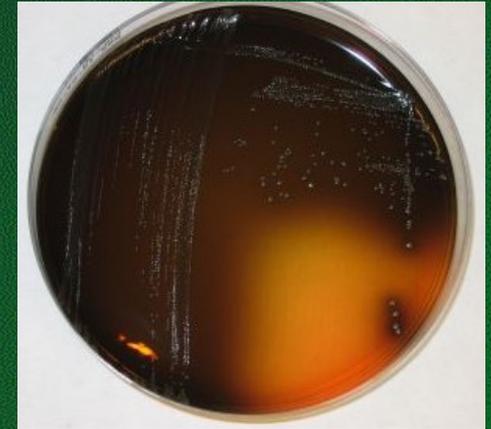
- Verificada pelos patógenos:
 - Gram-positivos (intoxicação)
 - Gram-negativos (infecção)
 - Fungos produtores de micotoxinas
 - Vírus



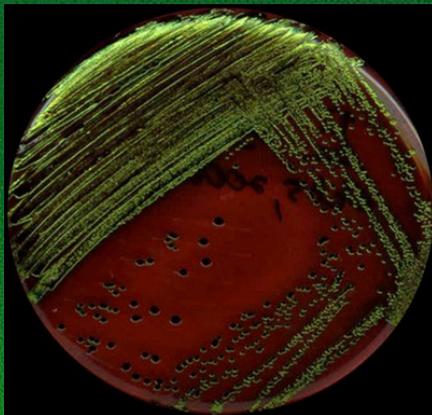
B. cereus



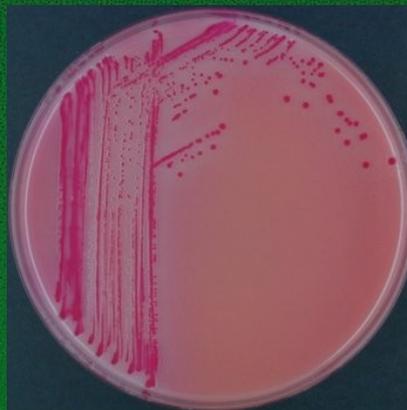
S. aureus



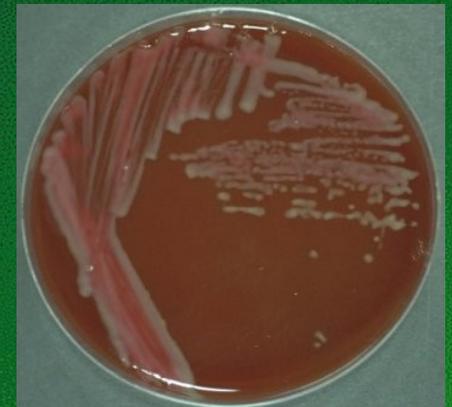
L. monocytogenes



E. coli



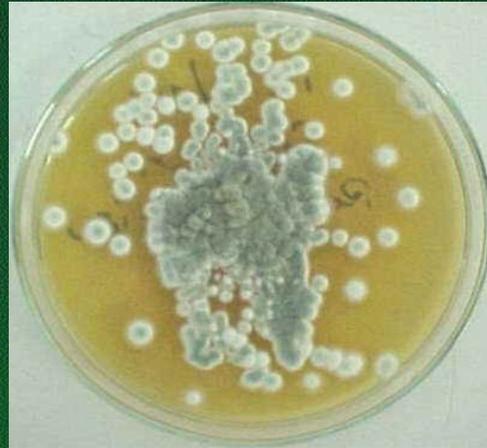
Salmonella



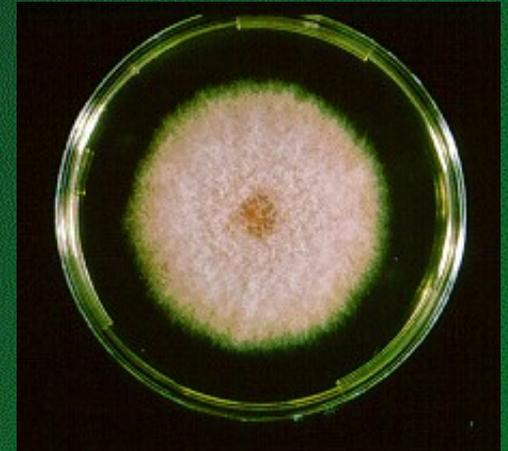
Campylobacter



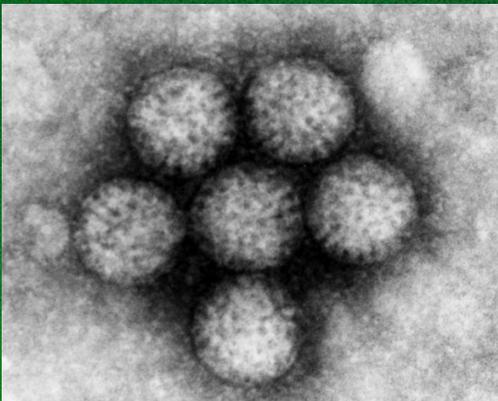
Aspergillus



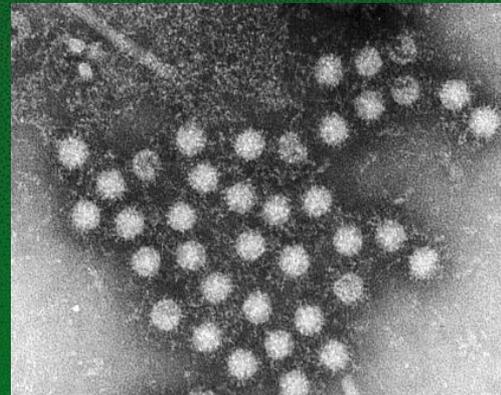
Penicillium



Fusarium



Rotavírus



Norwalk



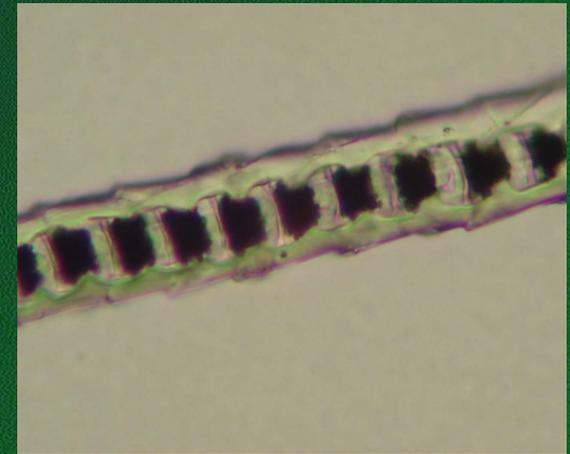
Poliomielite



Excretas de rato (6,5x)



Bárbula de pombo (200x)



Pêlo de rato (400x)



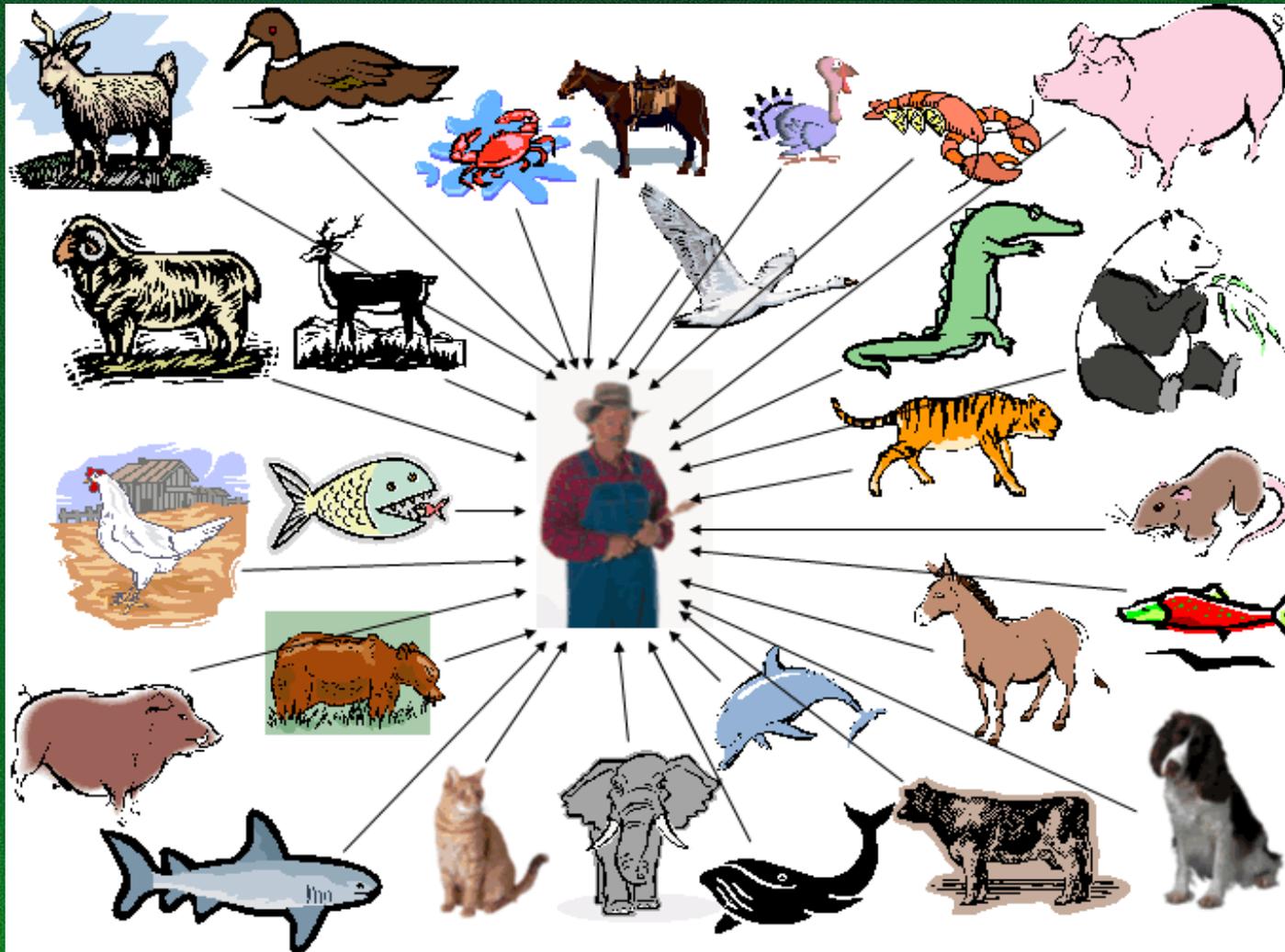
Ácaro (25x)



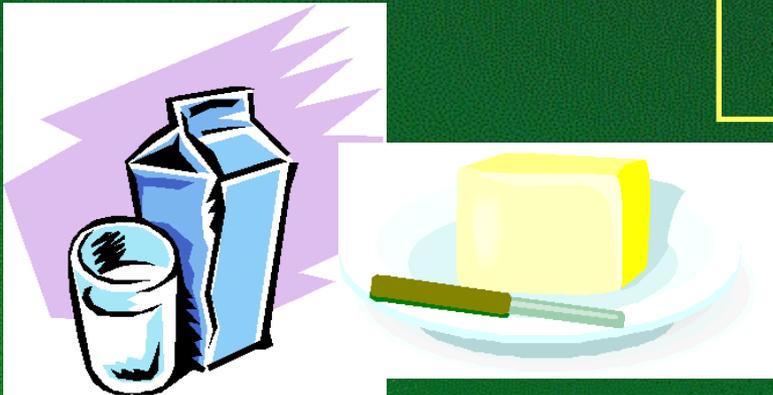
Ácaro (30x)



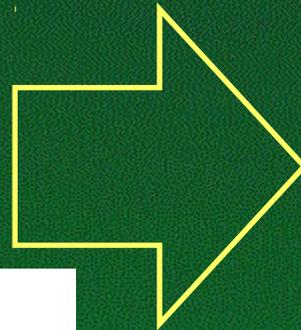
Ácaro (200x)



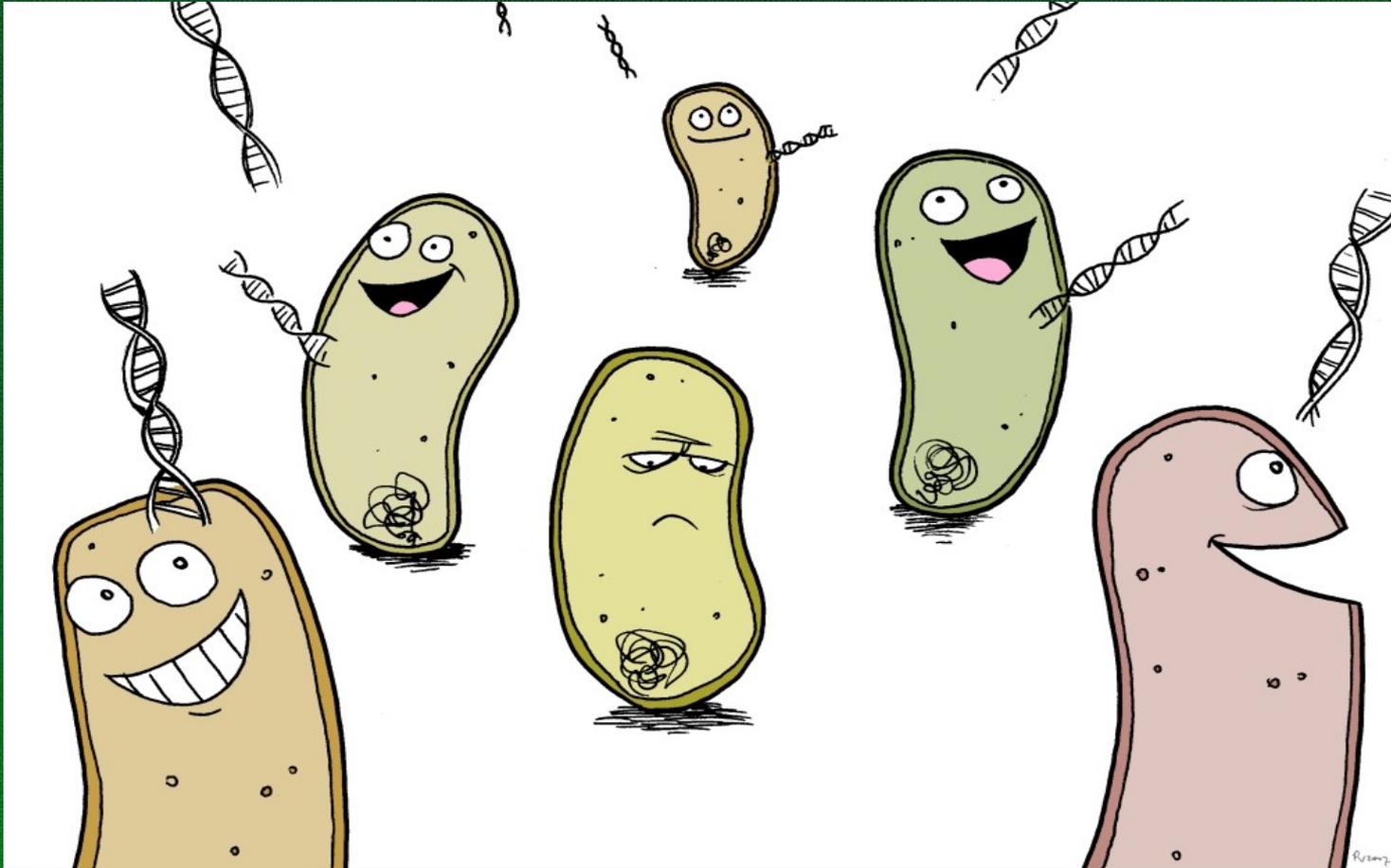
75% novas doenças = patógenos oriundos de animais / produtos



Produção industrial de
alimentos de origem animal



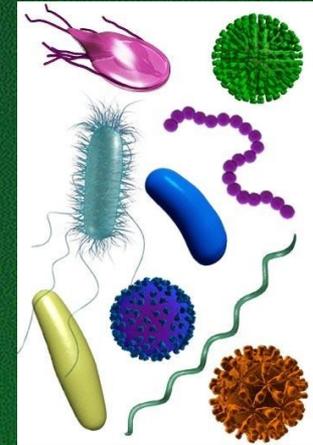
Intercâmbio internacional de animais/
produtos



Introdução e disseminação de patógenos



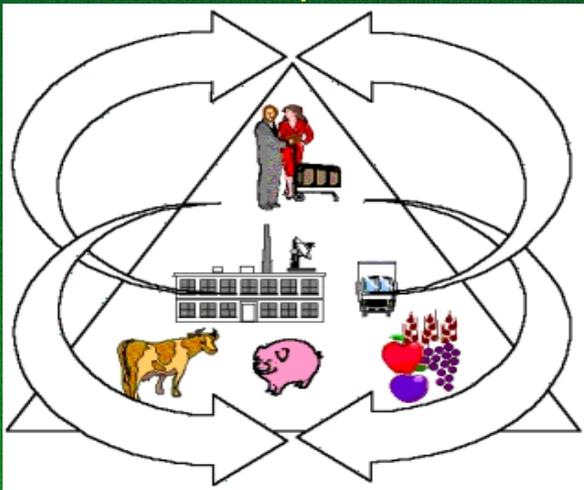
Preocupação por parte das autoridades de saúde pública



Implementação de programas de controle microbiológico



Métodos de análise eficientes



Empresas e consumidores

Mét. tradicional
ISO: incentivo métodos sensíveis
escolha mét. rápido: custo, aceito

Métodos de Verificação

- Métodos tradicionais / cultivo / clássicos

- Métodos alternativos / rápidos
 - Por que a procura?
 - Para que servem?
 - Usado em que situações?

Métodos Tradicionais

- Meios de cultura não seletivos, seletivos, complementados por provas bioquímicas
- Utilizam testes morfológicos
- Testes sorológicos

Métodos Tradicionais

Que demora!

■ Problemas

- Trabalhosos / requerem muito material
- Demorados
- Requerem laboratorista treinado
- Sujeito a falhas na interpretação dos resultados
- Sensibilidade insuficiente (capacidade de detectar)
- Especificidade insuficiente (detectar apenas o alvo)
- Repetitividade baixa (resultado não será o mesmo)
- Reprodutividade baixa (resultado estatisticamente diferente)



Métodos Tradicionais

- Farber et al. (2001)
 - Resultados de testes bioquímicos podem apresentar variabilidade pela ação de fatores ambientais sobre a expressão gênica
 - Baixo poder discriminatório
 - Risco de interpretações errôneas
 - Utilização de um número grande de determinações microbiológicas (custo de análise muito elevado)

Métodos Tradicionais

- Martin et al. (2006)
 - Métodos tradicionais, embora confiáveis e eficientes, requerem vários dias a semanas
 - Propriedade fenotípicas pelas quais as bactérias são identificadas podem não ser expressas e quando são, podem ser difíceis de ser interpretadas e classificadas
 - Possibilidade de células VPNC

Métodos

- 1993 até 2000 = surgimento de inúmeros métodos comerciais em países desenvolvidos (bioluminescência, imunológicos, bioquímicos, moleculares, impedância/condutância, etc)
- Atualmente: maior controle do mercado



Objetivo dos Métodos Alternativos

- Melhorar a eficiência dos laboratórios, simplificando trabalhos, reduzindo o custo no geral, aumentando a capacidade analítica
- Aumentar a confiabilidade dos resultados (*kit*)
- Aumentar a precisão dos resultados
- Técnico treinado

Métodos Alternativos

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

| Técnica | Aplicação | Metodologia |
|------------------------|--|---|
| Perfil plasmidial | Tipificação | Extração de DNA plasmidial, corte com enzimas e eletroforese |
| REA | Ferramenta epidemiológica | Extração de DNA, corte com enzimas (restrita) e eletroforese |
| Ribotipagem | Tipificação (cópia de genes ribossomais) | Extração de DNA, corte com enzimas (restrita) e eletroforese |
| PFGE | Ferramenta epidemiológica | Mudança repetida da orientação do campo elétrico |
| RAPD | Amplifica DNA em condições de baixa estringência | único <i>primer</i> , não sendo necessário saber a região de ligação |
| RT-PCR | Expressão de genes (virulência, toxinas), RNA viral | RNA extraído é convertido para cDNA que é amplificado por PCR |
| Nested PCR | Tipificação | Grupo de <i>primers</i> (amplificação); outro grupo de <i>primers</i> (re-amplificação) |
| Multiplex PCR | Tipificação | Uso de mais de um par de <i>primers</i> na mesma reação |
| REP-, ERIC-, BOX-(PCR) | Identificação e tipificação (gênero, espécie, subespécie) | Uso de <i>primers</i> de consenso; amplifica regiões entre estes elementos repetitivos |
| RFLP-PCR | Análise do polimorfismo do tamanho de fragmento de restrição | Fragmentos amplificados por PCR; digestão por uma ou mais endonucleases |
| PCR ribotipagem | Identificação e tipificação | Amplificação de sequências conservadas 5S, 16S e 23S do operon do RNAr |
| PCR tempo real | Deteção e quantificação | PCR convencional ; sondas fluorescentes; interpretação do espectro gerado |

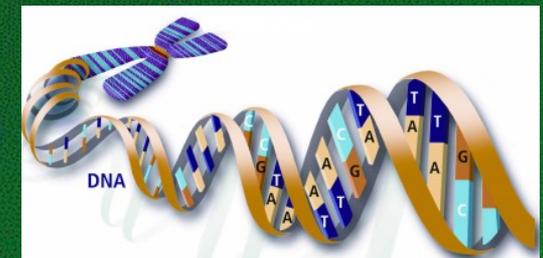
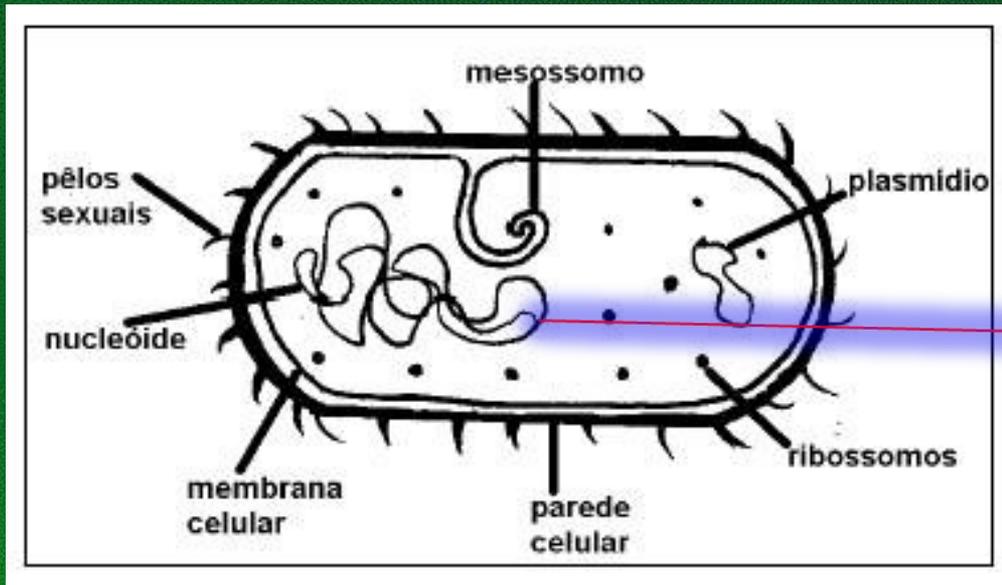
| Técnica | Vantagens | Desvantagens | Referências |
|----------------------------|--|--|---------------------------|
| Perfil plasmidial | Informações epidemiológicas | Perda ou ganho de plasmídeo; pouco valor para bactérias com baixa incidência | Kolstad et al. (1992) |
| REA | Uso de endonuclease | Dificuldade de interpretação visual dos perfis (centenas de bandas) | Wojciech et al. (2004) |
| Ribotipagem | Bandas mais visíveis e comparáveis | custo elevado | Aarestrup (2006) |
| PFGE | Agarose mantém DNA intacto | DNA de alto peso molecular pode ser submetido à digestão pela endonuclease | Arbeit et al. (1990) |
| RAPD | Detectar polimorfismos do DNA | Escolha de iniciadores que originem resultados reproduzíveis | Welsh & McClelland (1990) |
| RT-PCR | Amplifica DNA obtido por meio de TR de RNA | | Tang & Persing (1999) |
| Nested PCR | | Diversos ciclos de amplificação | Konemann et al. (2001) |
| Multiplex PCR | Amplifica diferentes alvos de microrganismos, uso na rotina, baixo R\$ | Redução na sensibilidade de detecção; necessidade de ensaios preliminares | Tang & Persing (1999) |
| REP-, ERIC-, BOX- (PCR) | Uso em diferentes regiões do genoma | Amplificação de sequências inespecíficas (ERIC) | Gillings & Holley (1997) |
| RFLP-PCR | Associação da técnica à PFGE | | Farber et al. (2001) |
| PCR ribotipagem | Uso para diferenciar espécies | | Shangkuan et al. (2000) |
| PCR tempo real | Estudos quantitativos, tubo fechado, não há necessidade de eletroforese | custo elevado | Heid et al. (1996) |

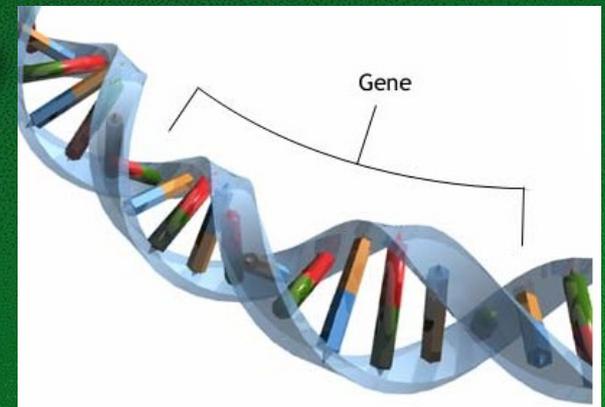
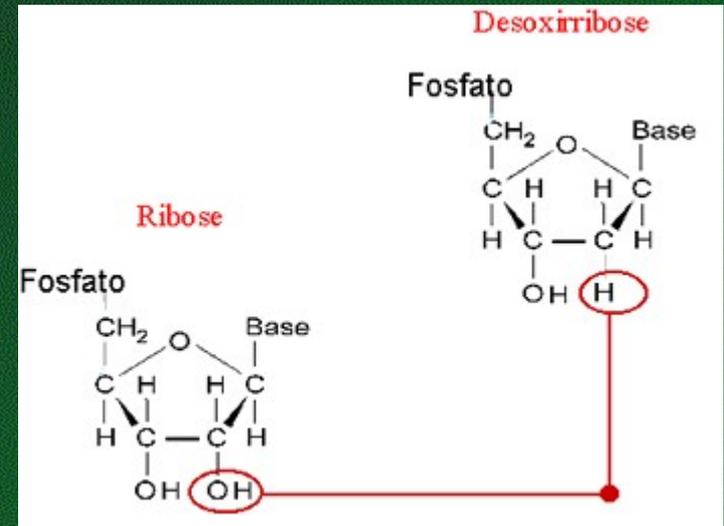
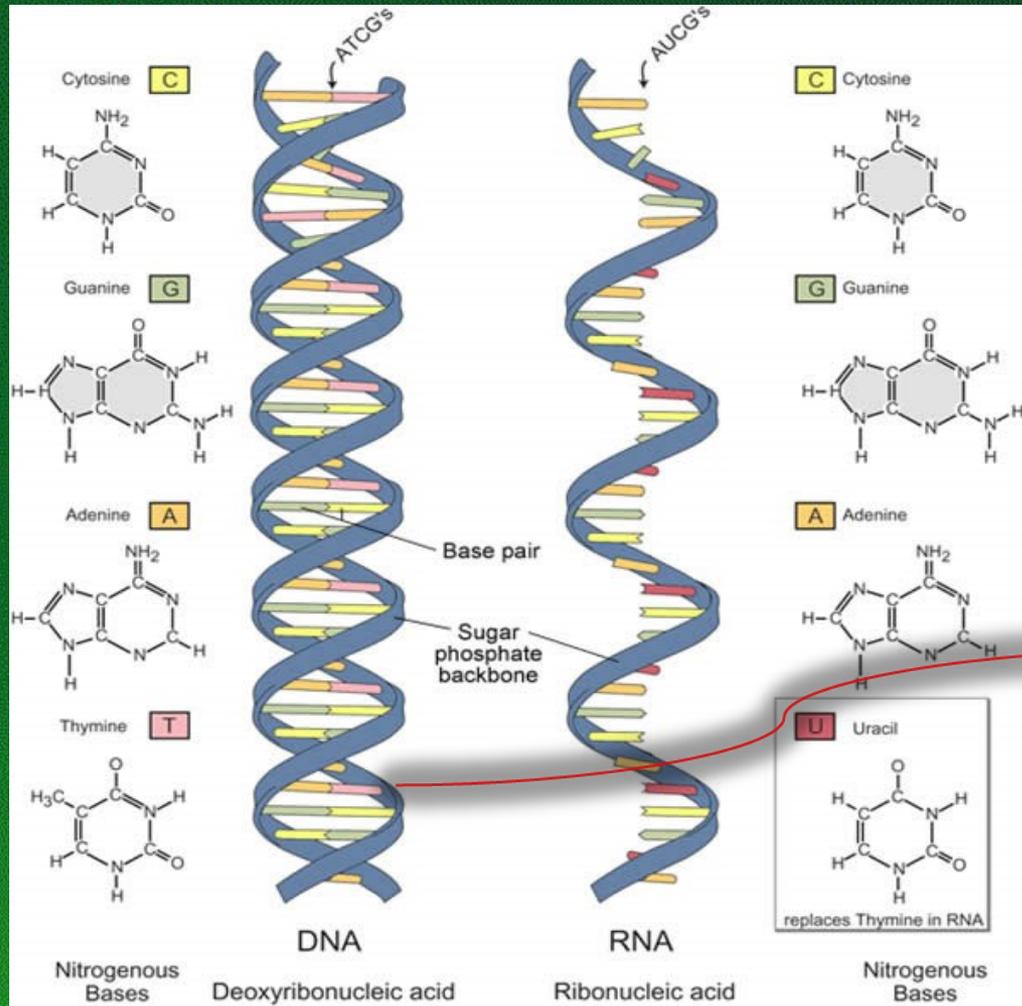
Métodos Alternativos

- Técnicas genotípicas referem-se à caracterização do DNA cromossômico, plasmidial ou total de um micro-organismo, características relativamente estáveis

- Técnicas moleculares:
 - Aplicação direta na detecção e caracterização de bactérias patogênicas em alimentos
 - Destaca-se a PCR (Boer e Beumer, 1999; Farber, 1996; Malorny et al. (2003)

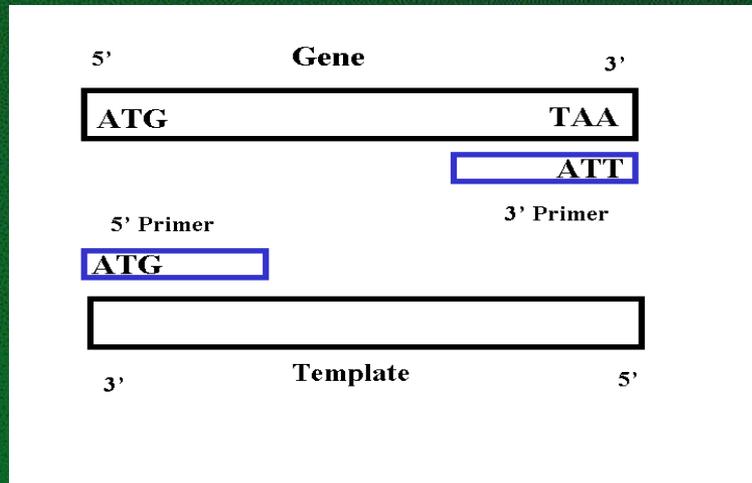
Revisão



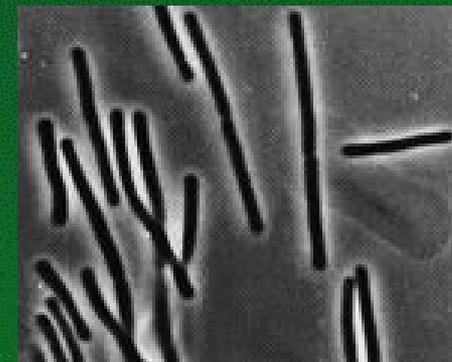
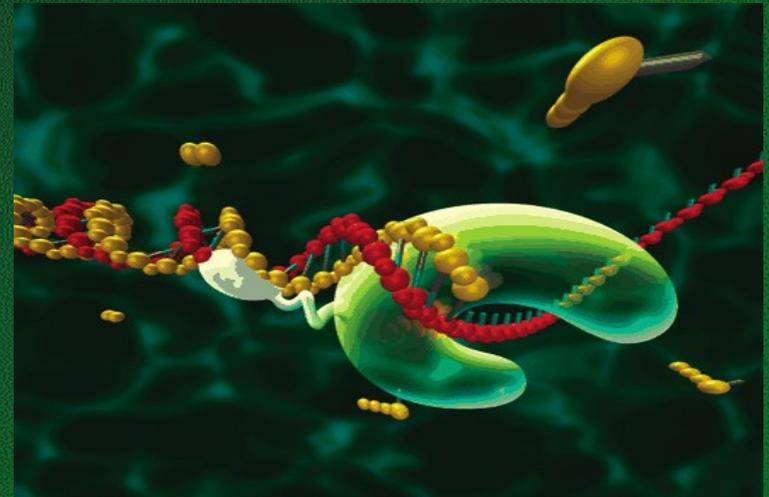


Informação para produzir determinada proteína

Primer



Polimerase



Thermus aquaticus (Taq)

Exemplo de mistura para reação qPCR

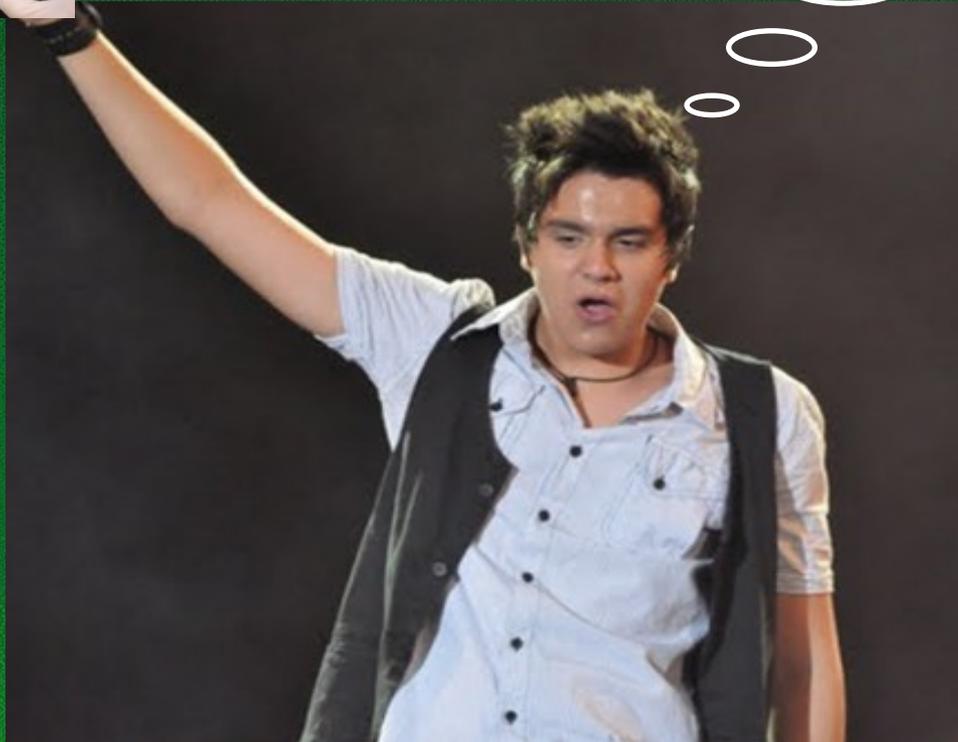


400 nM *primers* (de cada 1 do par)
250 nM sonda
200 μ M de cada dGTP, dATP, dCTP
400 μ M dUTP*
Tampão PCR (Tris-HCl, pH 8,4)
50 mM KCl
4,5 mM MgCl₂
1 U Platinum *Taq* polimerase
DNA ou RNA alvo
H₂O Ultra-pura

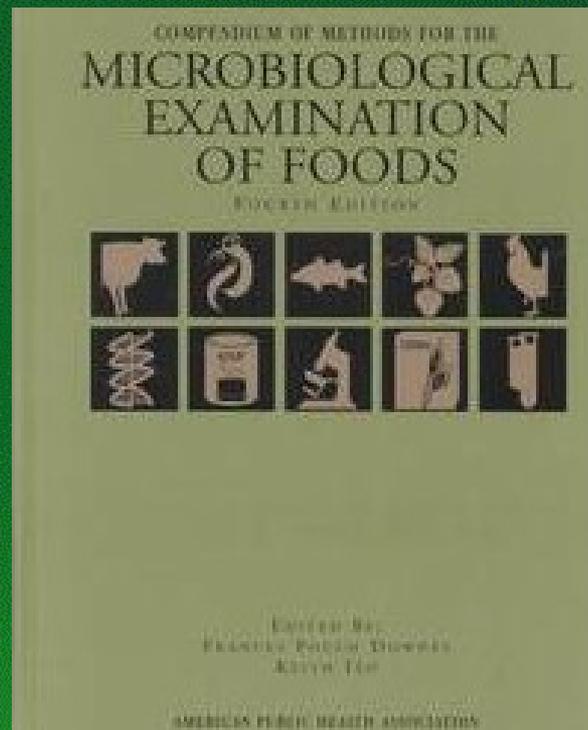
*dUTP suscetível à hidrólise pela enzima bacteriana uracil-N-glicosilase.

Adição da enzima na mistura PCR permite hidrólise seletiva e remoção dos produtos de amplificação contaminante da mistura de PCR

PCR



Métodos Rápidos (PCR)



“It is difficult to find a journal that does not describe some use of these techniques” (APHA, 2001)

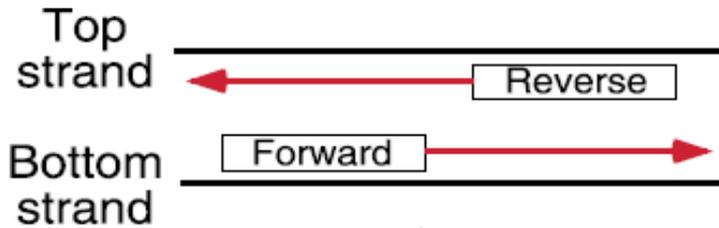
“É difícil encontrar uma revista científica que não descreva algum uso destas técnicas”

Reação da Polimerase em Cadeia (PCR)

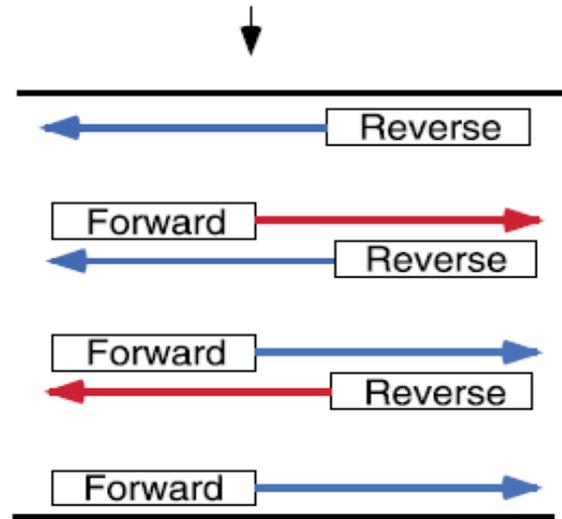
- Kary B. Mullis (1983): invenção da PCR
- Técnica altamente sensível
- Pequenas quantidade de sequências de DNA ou RNA específicas podem ser enzimaticamente amplificadas, até que sejam obtidas milhões de cópias da sequência alvo



Polymerase chain reaction



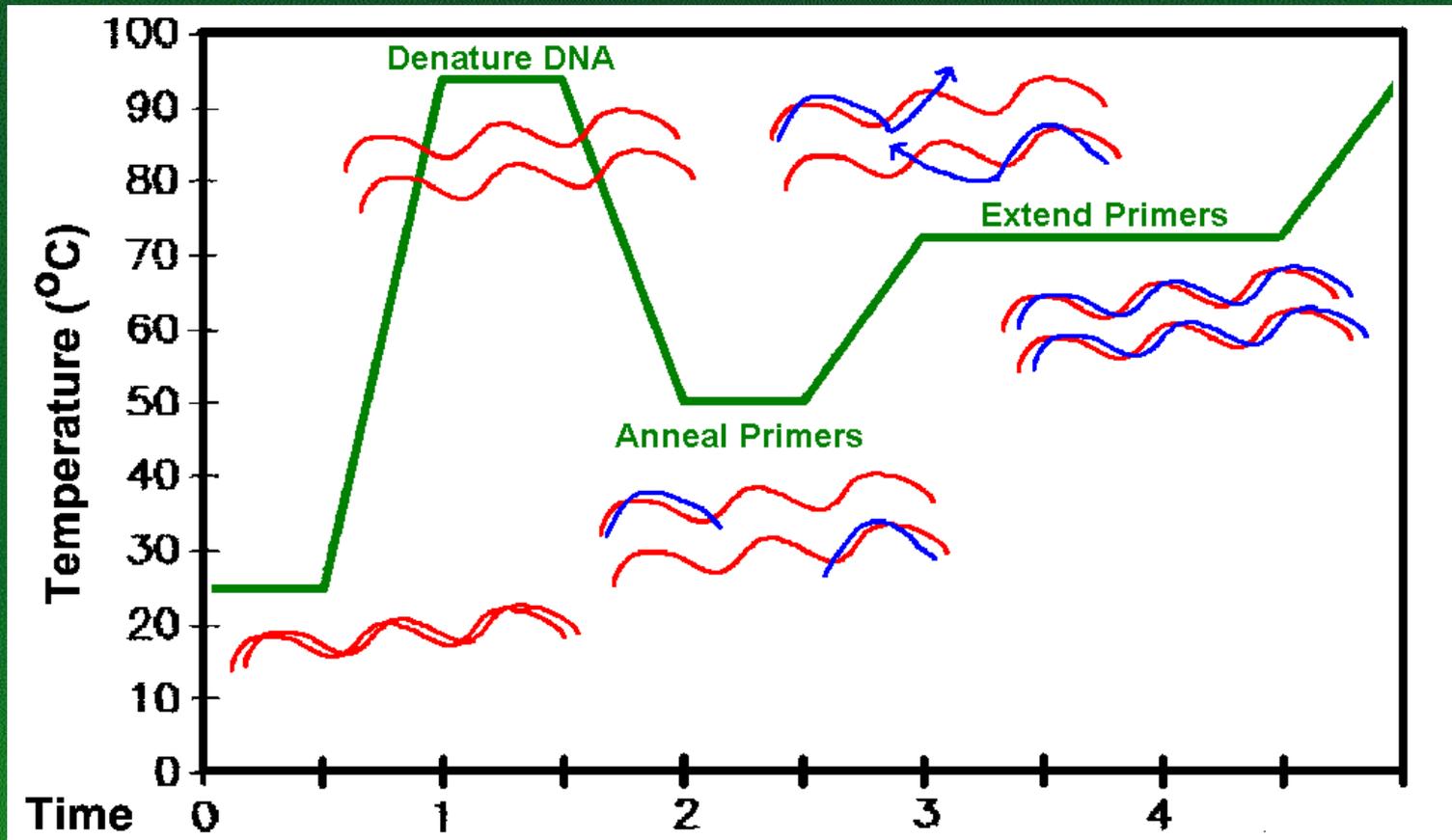
First cycle
2 copies
when complete



Second cycle
4 copies
when complete

Nth cycle
 2^n copies
when complete

PCR

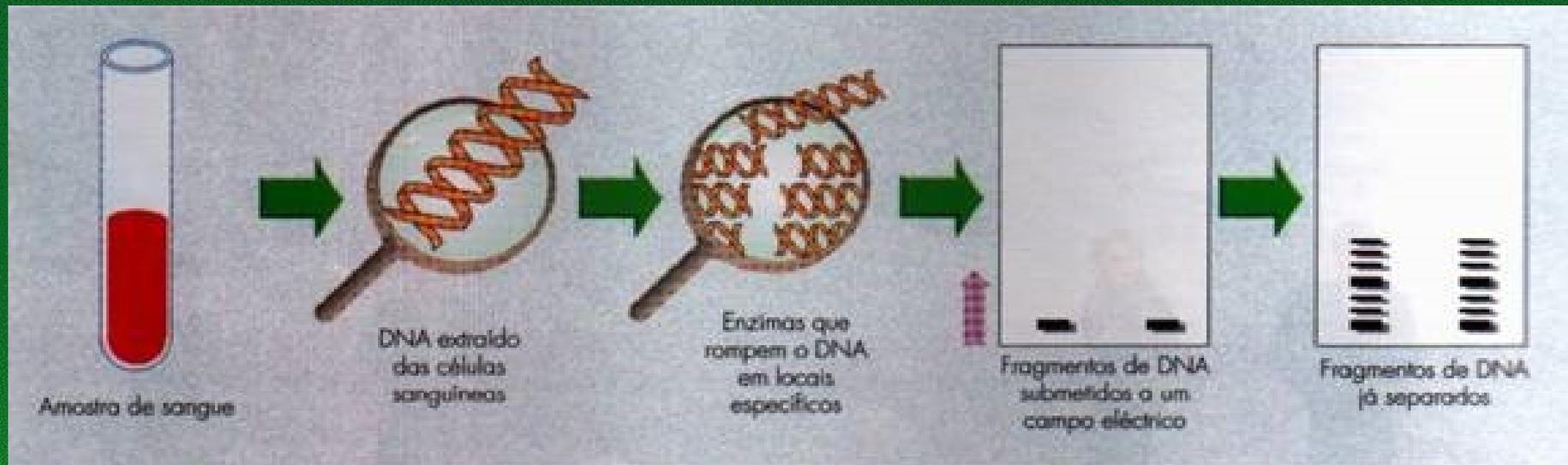


Detectar ?

Nao!
Quantificar



PCR – Sistema Aberto



↓
(detecção)

PCR- Sistema Fechado (BAX System)

Amostra



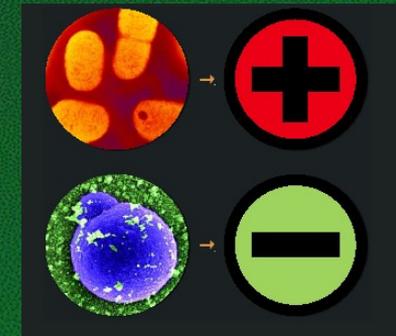
pré-enriquec.

2. Amplificação



MO: está ou
não está ?

3. Detecção



Sim

Não

resposta

BAX® System Analysis Interface, Instrument Serial Number: Not available - 270603.BAX

File View Operation Diagnostics Help

| | ID | #ID | # | | | | | | | | |
|-----------------------|---------------------------------------|--|--|--|-----------------------|-----------------------|---------------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| <input type="radio"/> | <input checked="" type="radio"/> VI-1 | <input checked="" type="radio"/> VI-9 | <input checked="" type="radio"/> VI-17 | <input checked="" type="radio"/> VI-25 | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input checked="" type="radio"/> CEPA | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |
| <input type="radio"/> | <input checked="" type="radio"/> VI-2 | <input checked="" type="radio"/> VI-10 | <input checked="" type="radio"/> VI-18 | <input checked="" type="radio"/> VI-26 | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |
| <input type="radio"/> | <input checked="" type="radio"/> VI-3 | <input checked="" type="radio"/> VI-11 | <input checked="" type="radio"/> VI-19 | <input checked="" type="radio"/> VI-27 | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |
| <input type="radio"/> | <input checked="" type="radio"/> VI-4 | <input checked="" type="radio"/> VI-12 | <input checked="" type="radio"/> VI-20 | <input checked="" type="radio"/> VI-28 | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |
| <input type="radio"/> | <input checked="" type="radio"/> VI-5 | <input checked="" type="radio"/> VI-13 | <input checked="" type="radio"/> VI-21 | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |
| <input type="radio"/> | <input checked="" type="radio"/> VI-6 | <input checked="" type="radio"/> VI-14 | <input checked="" type="radio"/> VI-22 | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |
| <input type="radio"/> | <input checked="" type="radio"/> VI-7 | <input checked="" type="radio"/> VI-15 | <input checked="" type="radio"/> VI-23 | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |
| <input type="radio"/> | <input checked="" type="radio"/> VI-8 | <input checked="" type="radio"/> VI-16 | <input checked="" type="radio"/> VI-24 | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |

Well Information

Sample ID:

Target:

Control:

Kit Lot Number:

Description:

Data

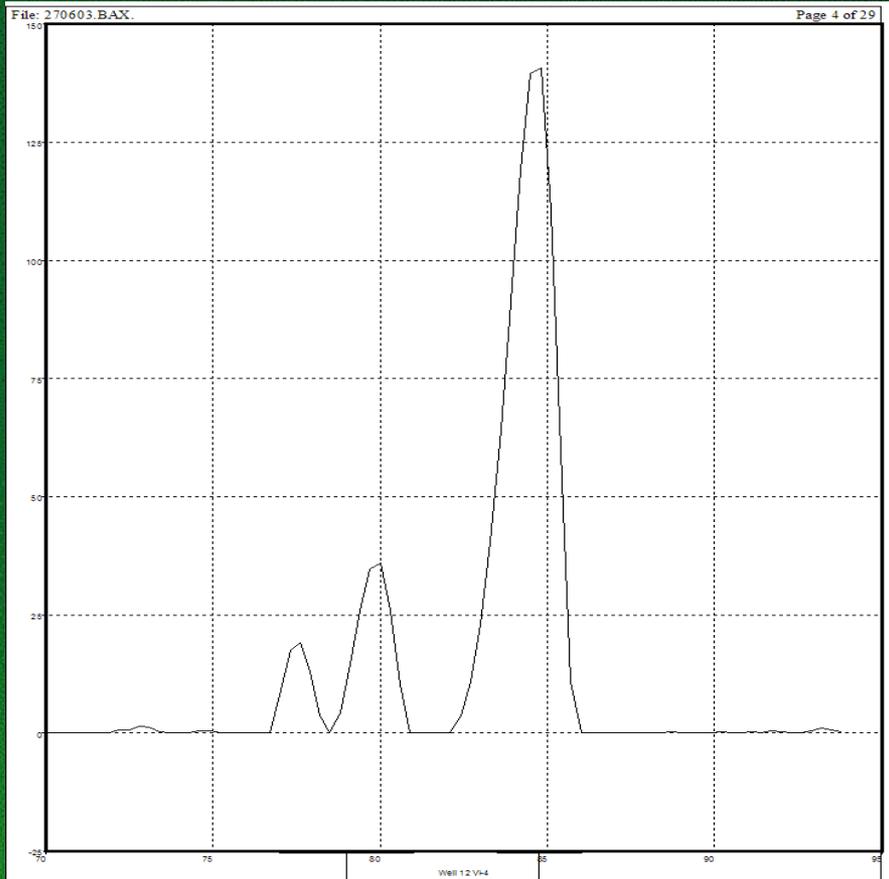
Processed

Raw

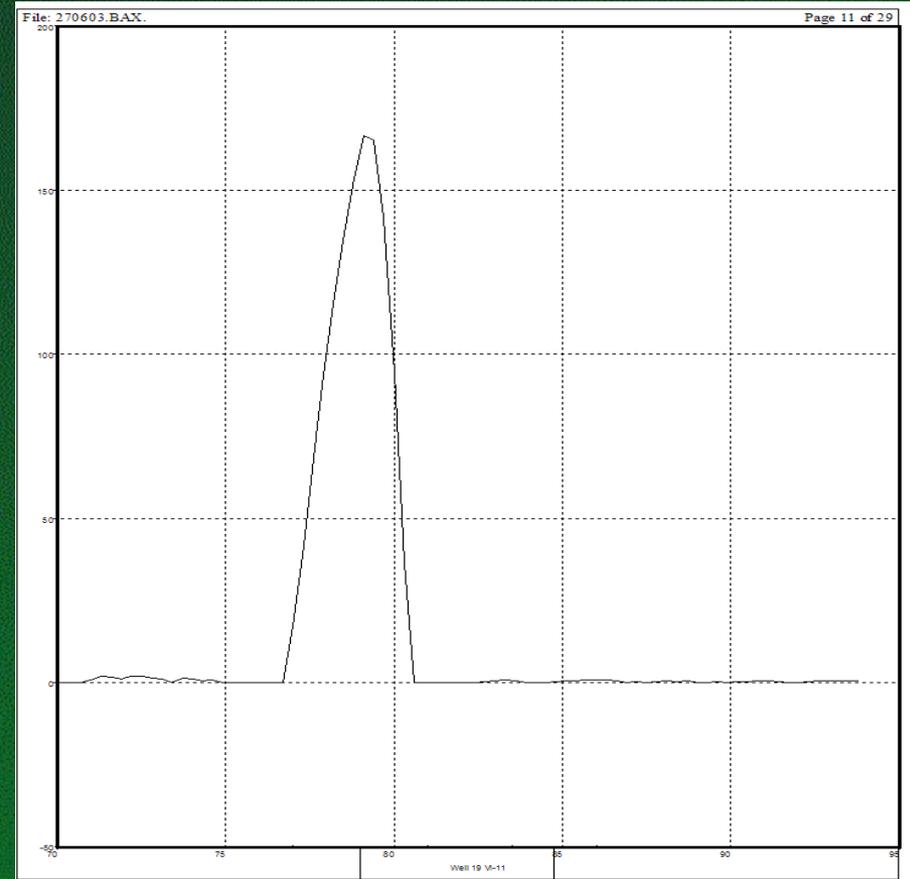
Ready

Windows Taskbar: Iniciar, BAX® System Analyli..., Sem título - Bloco de ..., PT, 16:47

Resultados do “rack report” do BAX®System para detecção de *Listeria monocytogenes*



Perfil da curva de fusão (“melting curve”) de *Listeria monocytogenes* da amostra positiva



Perfil da curva de fusão (“melting curve”) do controle interno

Aprovação MAPA - *Salmonella*

- INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 41, DE 7 DE JUNHO DE 2004
VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA UTILIZADA PELO SISTEMA DE
DETECÇÃO PATOGENICA PARA ALIMENTOS E AMOSTRAS
AMBIENTAIS - A-BAX® PARA DETECÇÃO DE SALMONELLA
SPP EM AMOSTRAS DE ALIMENTOS, ÁGUA E AMOSTRAS
AMBIENTAIS-SWAB, COMO MÉTODO ALTERNATIVO
EQUIVALENTE AO MÉTODO DE REFERÊNCIA DO MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO – MAPA



Aprovação MAPA - *Listeria*

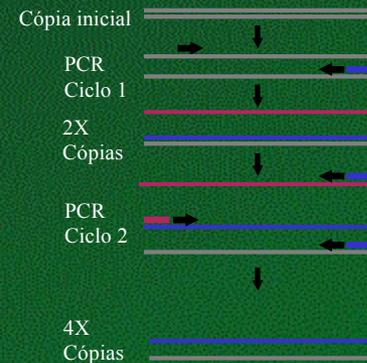
- INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 40, DE 12 DE DEZEMBRO DE 2005. ISOLAMENTO E IDENTIFICACAO DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* EM CARNE VERMELHA, CARNE DE AVE, OVOS E AMOSTRAS AMBIENTAIS, MLG 8.04 – METODOLOGIA ALTERNATIVA DE *LISTERIA* A-BAX MLG-8 A .01



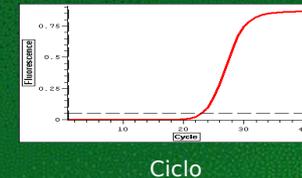
PCR-tempo real (qPCR)



- Segunda geração de métodos que empregam a PCR (qPCR)
- Amplificação e detecção em uma única reação em tubo fechado
- Baixo risco de contaminação
- Detecção do aumento do número de cópias do DNA alvo à medida que a reação é realizada
- Redução do tempo de análise



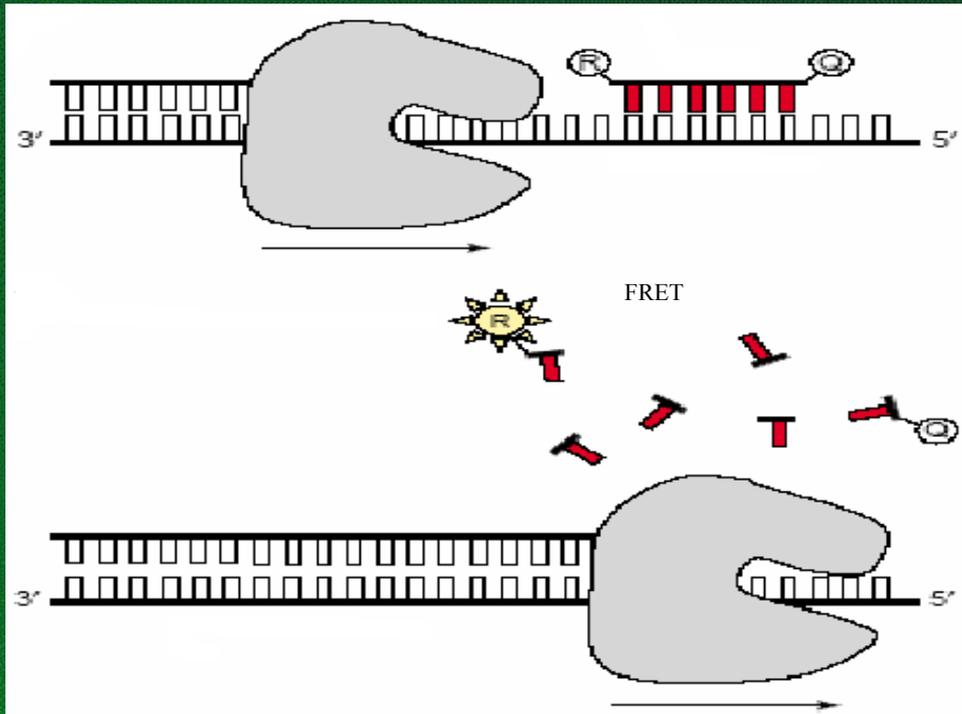
30-45 Ciclos



monitora o progresso da PCR em TR

Exemplos de qPCR

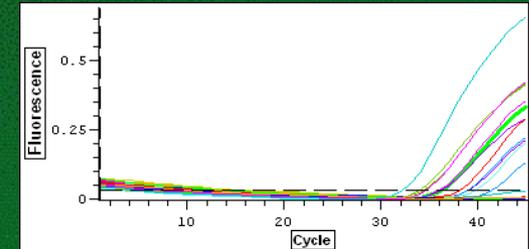




← Corantes fluorogênicos ligados

← Síntese de DNA e clivagem da Sonda - 5' exonuclease

→

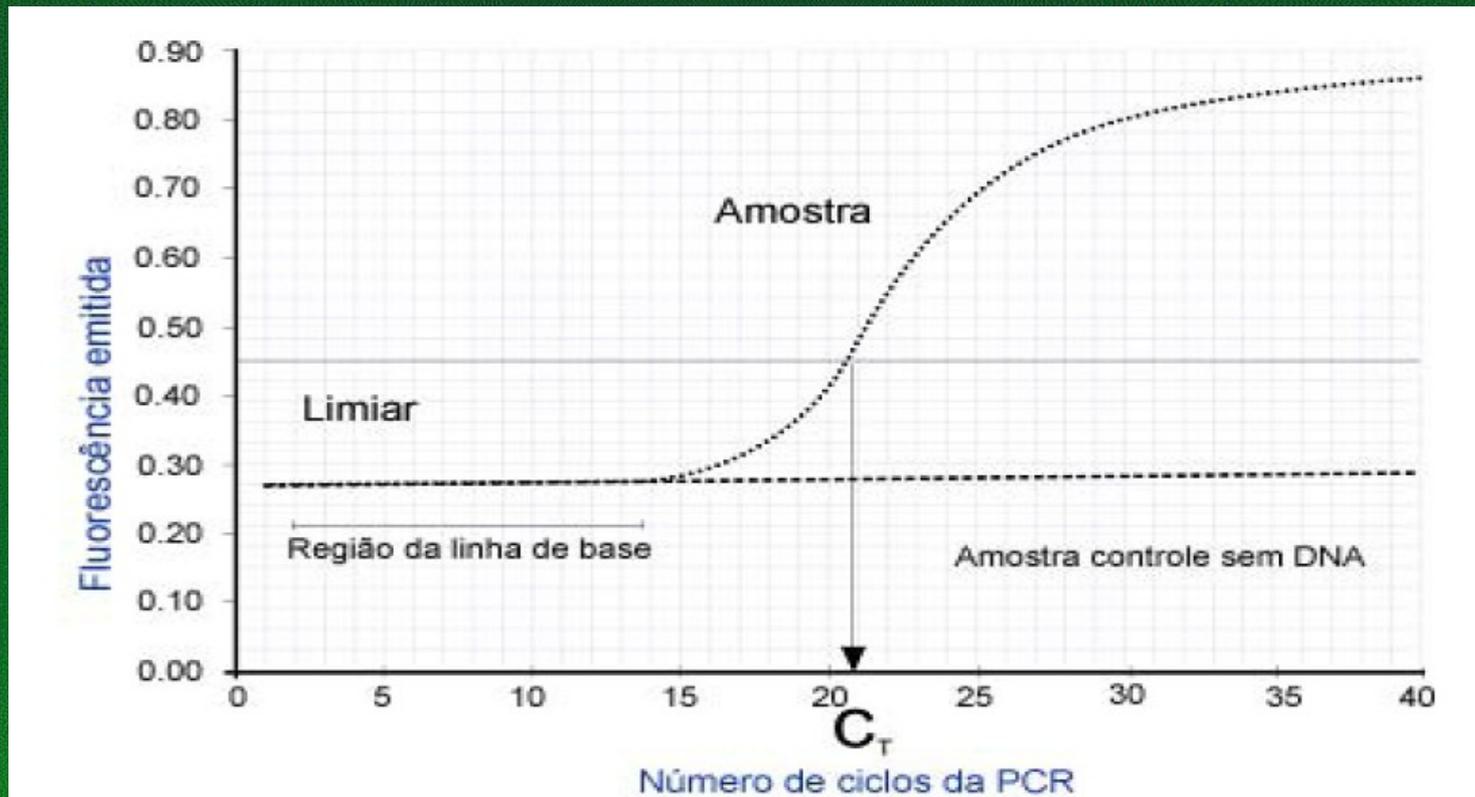


Deteção / PCR-RT

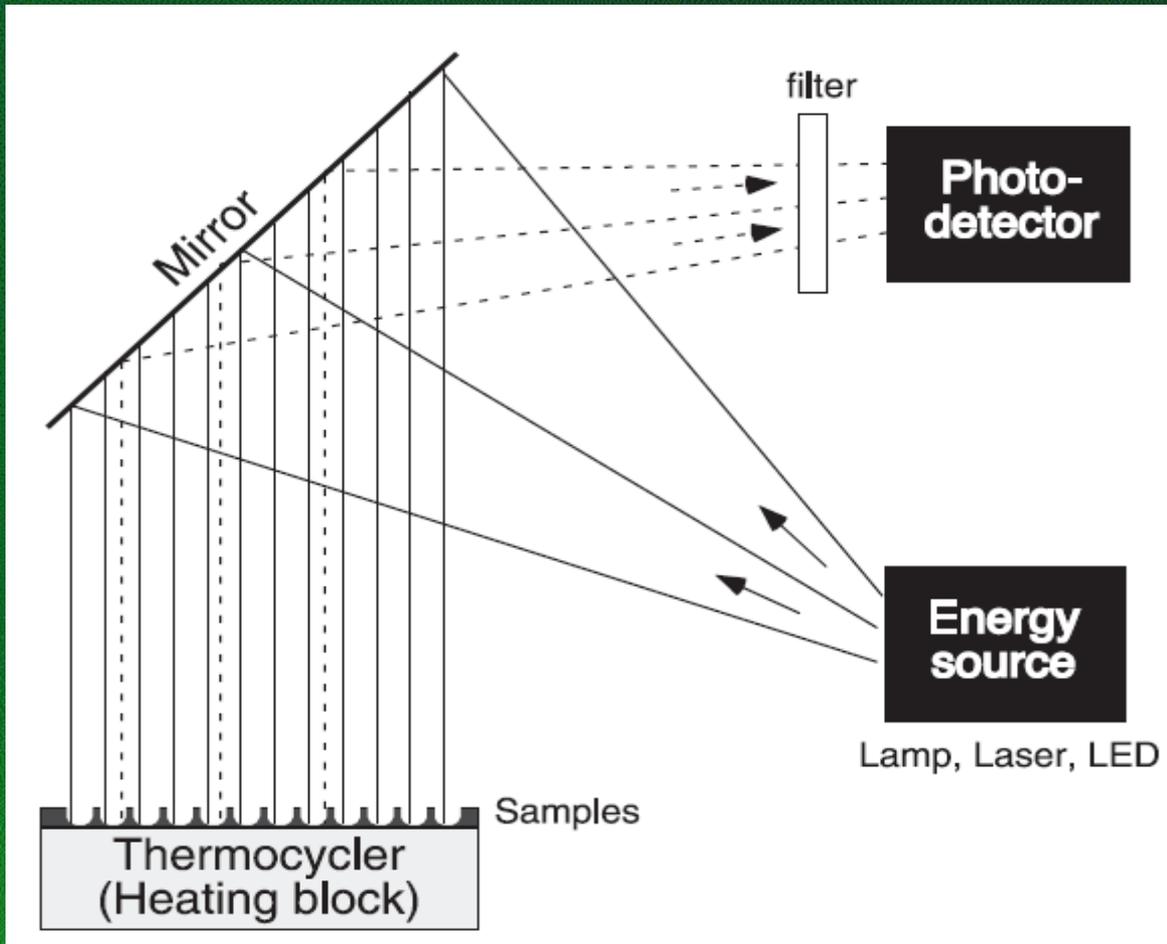
≠ marcadores fluorogênicos
sonda: hibrid.reg. internas

Fonte: Mocellin et al., TRENs in Molecular Biology.,2003

Curva de amplificação da qPCR



Ct – Threshold cycle



Amostras são inseridas no termociclador que controla a temperatura de cada ciclo da PCR

Amostras são excitadas e a fluorescência é mensurada por um fotodetector em cada ciclo da PCR

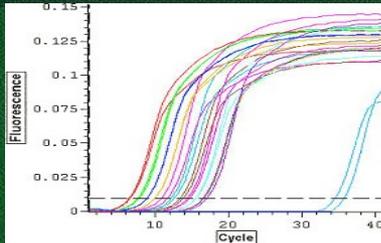
LED (light-emitting diode)

Fonte: Valasek & Repa, 2005

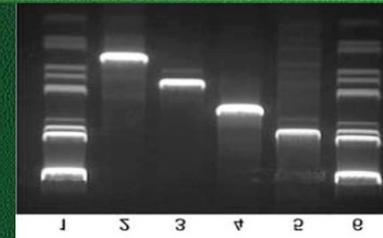
Comparação entre técnicas fenotípicas e genotípicas



- Gandra et al. (2008)
 - Tempo de análise menor para as técnicas baseadas em PCR
 - Resultados em 6 a 8 h
 - Resultados falso-positivos (amplificação de DNA proveniente de células mortas)
 - Viabilidade de micro-organismos presentes (RNA)
 - Preparo da amostra, inclusão de um IAC, purificação do DNA/RNA



PCR



Vantagens qPCR

- Maior alcance dinâmico na detecção
- Nenhum processamento pós-PCR
- Alta sensibilidade
- Coleta de dados na fase exponencial da PCR
- Um aumento no sinal repórter fluorescente é diretamente proporcional ao número de amplicons gerados
- A sonda clivada fornece um registro permanente de amplificação de um amplicon

Desvantagens PCR convencional

- Baixa precisão
- Baixa sensibilidade
- Baixa resolução
- Não automatizado
- Discriminação baseada apenas no tamanho do amplicon
- Resultados não são expressos como números
- Brometo de etídio para a coloração não é quantitativa
- Pós-processamento da PCR

Preparo de amostras

- Rodríguez-Lázaro et al. (2007)
 - Garantir boa homogeneização
 - Aumentar a concentração do organismo alvo
 - Reduzir ou excluir substâncias inibitórias (etapa de enriquecimento)
 - Procedimentos de pré-amplificação devem ser adaptados para cada matriz alimentícia
 - variação na homogeneidade; consistência; composição e microbiota



Outras metodologias para o preparo de amostras

- Glynn et al. (2006)
- Filtração
- Centrifugação
- Uso de detergentes e solventes orgânicos
- Tratamento com enzimas
- Inclusão de aditivos na PCR (BSA)
- Diluição da amostra



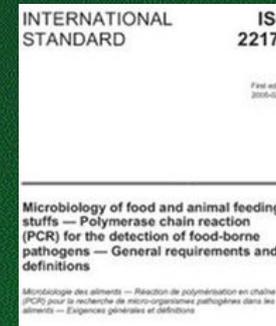
Limitações da PCR



- Farber et al. (2001); Glynn et al. (2006); Martin et al. (2006)
 - Alto custo inicial
 - Falta de legislação que padronize e valide estas técnicas
 - Desenvolvimento de sistemas automatizados (extração, purificação)

Avanços da qPCR na microbiologia de alimentos

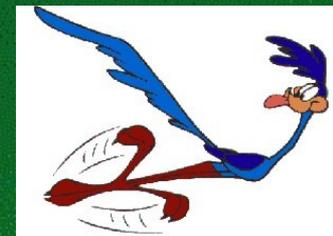
- Postollec et al. (2011)



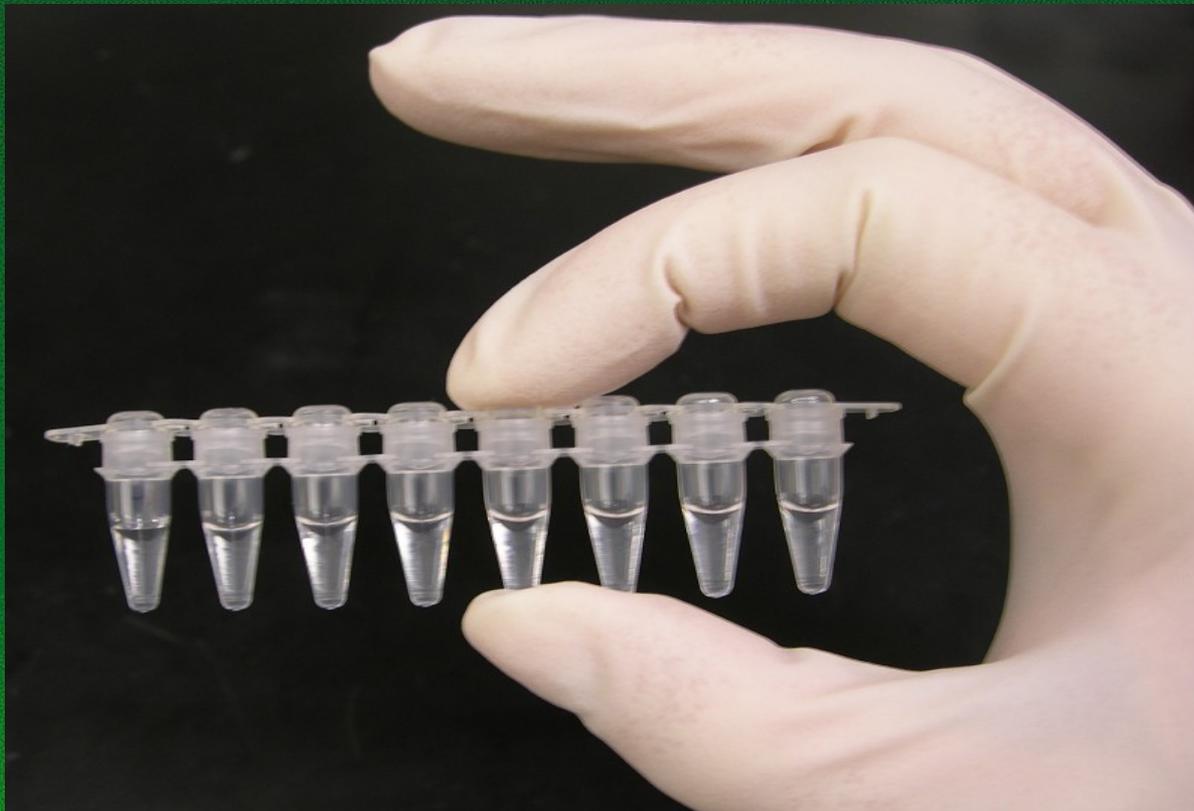
- qPCR: detectar, identificar, quantificar micro-organismos
- ISO: detecção de patógenos por PCR (ISO 22174:2005; ISO/TS 20836:2005; ISO 20837:2006; ISO 20838:2006)
- Fase inicial: expressão gênica; multiplicação e atividade microbiana em matrizes complexas para controles industriais

Avanços da qPCR na microbiologia de alimentos

- PCR: > rapidez, sensibilidade e especificidade
 - detecta populações dominantes, sub-dominantes, células mortas ,VPNC, quantifica genes e expressão gênica
- Automação: Isolamento do ácido nucleico e preparo qPCR (barato e adequado para rotina)



Implementação do qPCR no Laboratório



Visão do administrador



Terror!

Visão do técnico



...astro da magia!

Visão do cliente



...solução dos problemas!

Considerações técnicas para implementação da (RT-)qPCR

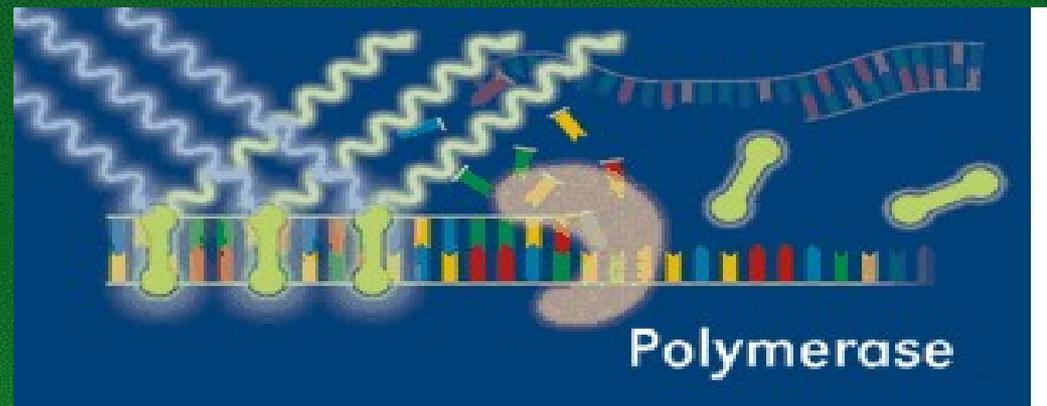
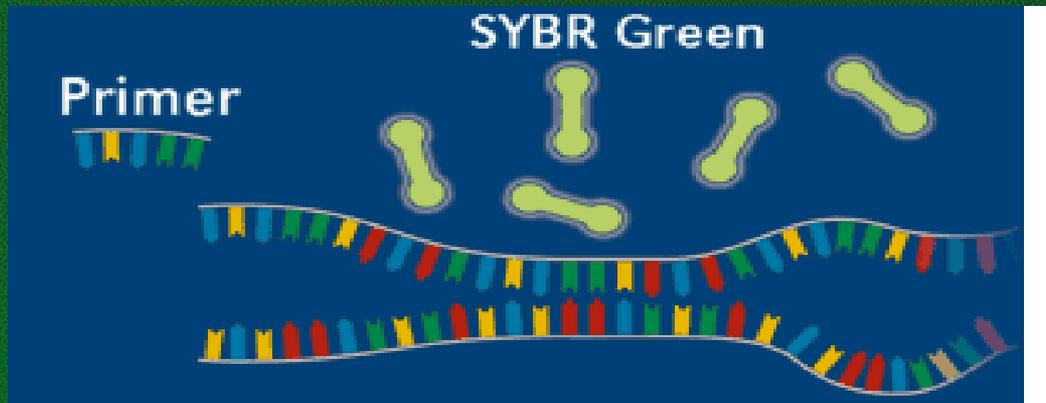


- Extração do ácido nucleico
 - Componente mais importante para assegurar reprodutibilidade
 - Uso de *kits* comerciais ou com adaptações dependendo da matriz
 - RNA: extração laborosa, especialmente em matrizes complexas ou gordurosas
 - fácil degradação, rapidamente analisado

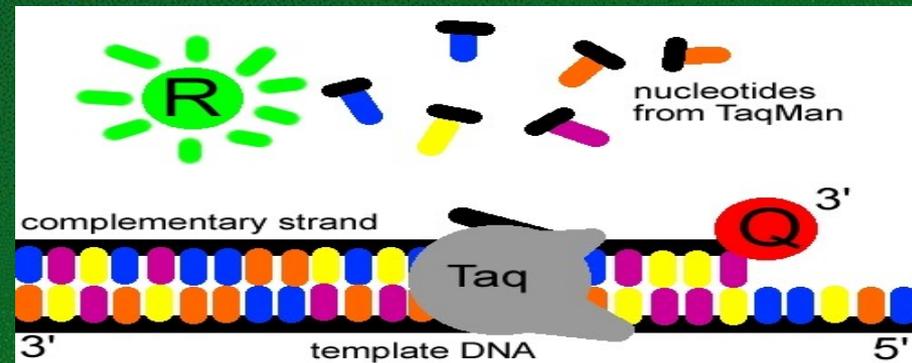
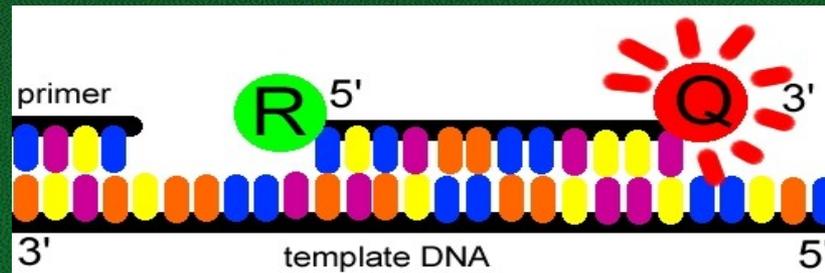
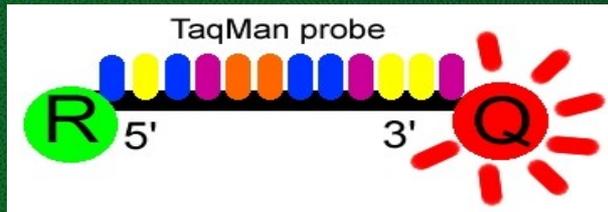
Considerações técnicas para implementação da (RT-)qPCR

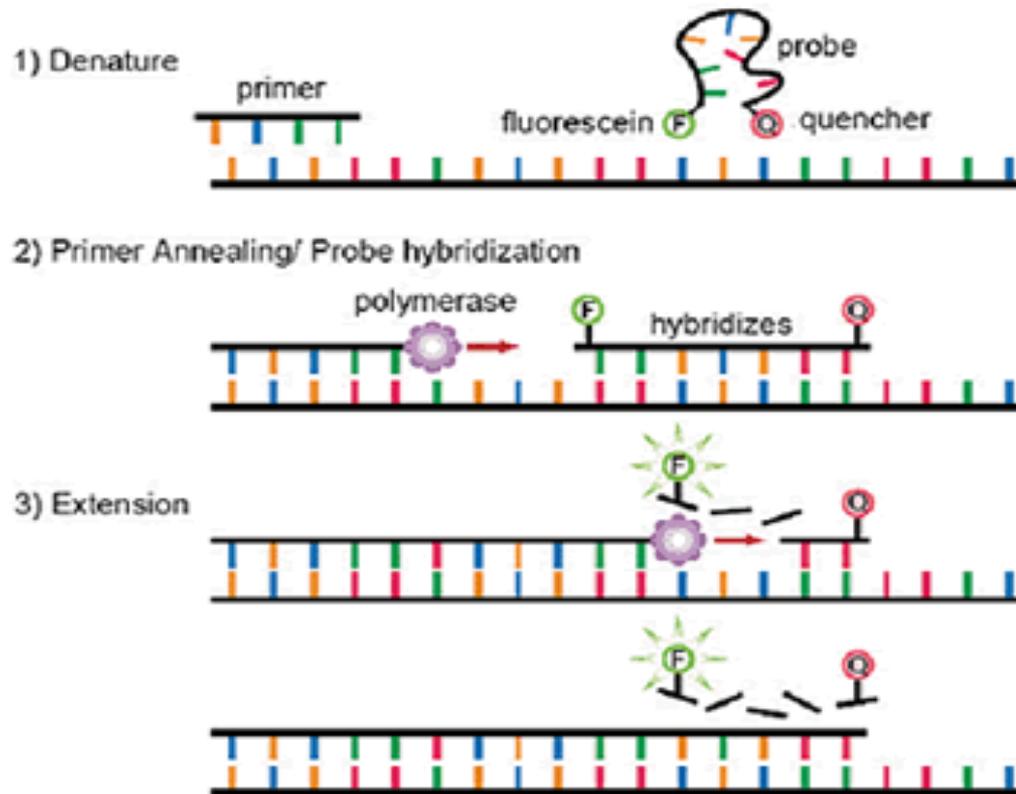
- Detecção química
 - Disponibilidade de vários sistemas
 - Modo de ação, vantagens e limitações
 - Mais usados na Micrbiologia de Alimentos:
 - DNA binding dye (SYBR Green)
 - Hydrolisis Probe (5' nuclease assay)

Sistema SYBR Green

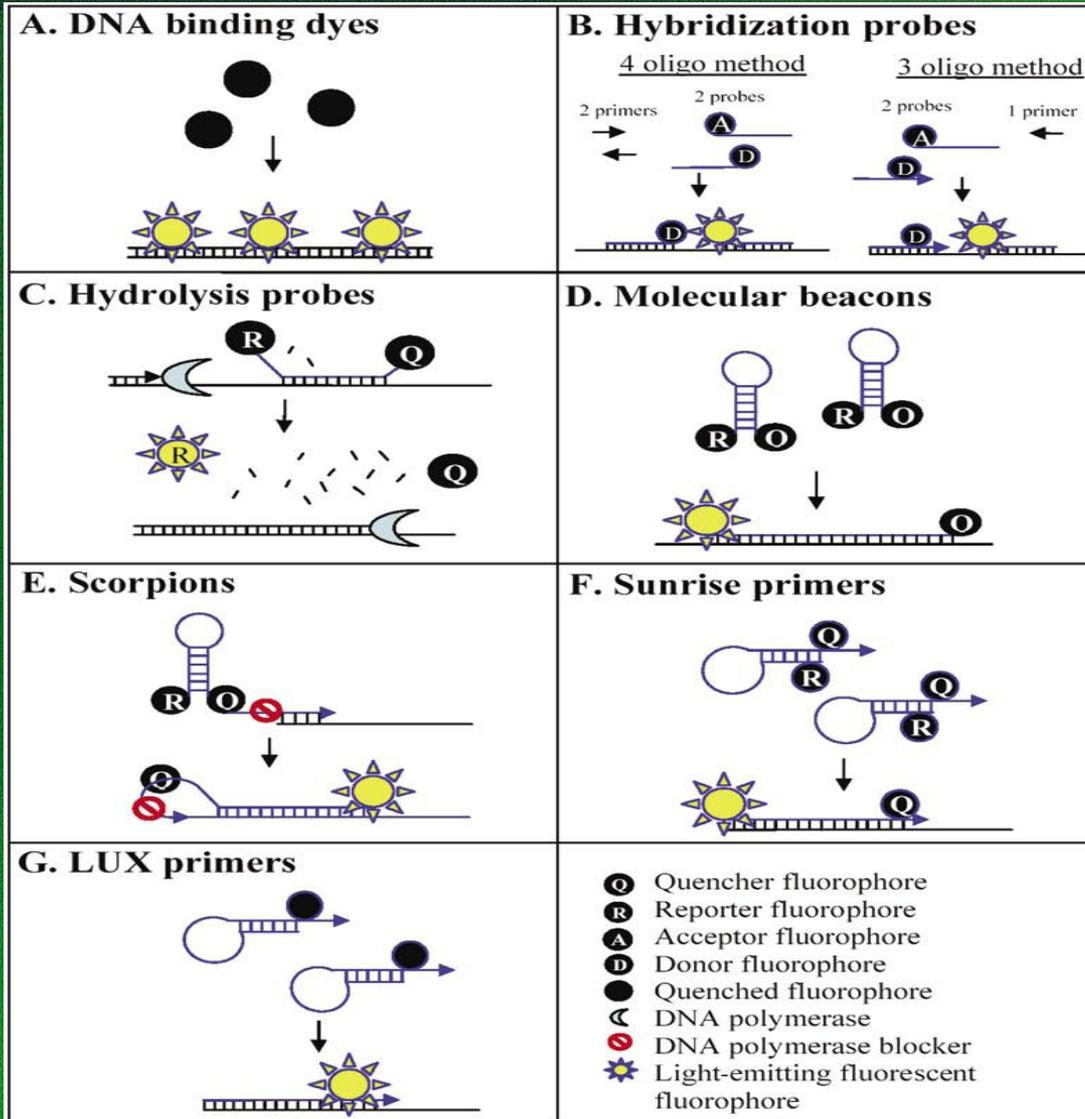


Sistema TaqMan





TaqMan® Probe Method



Tipos de sistemas químicos usados para a detecção na qPCR

Fonte: Wong & Medrano, 2005

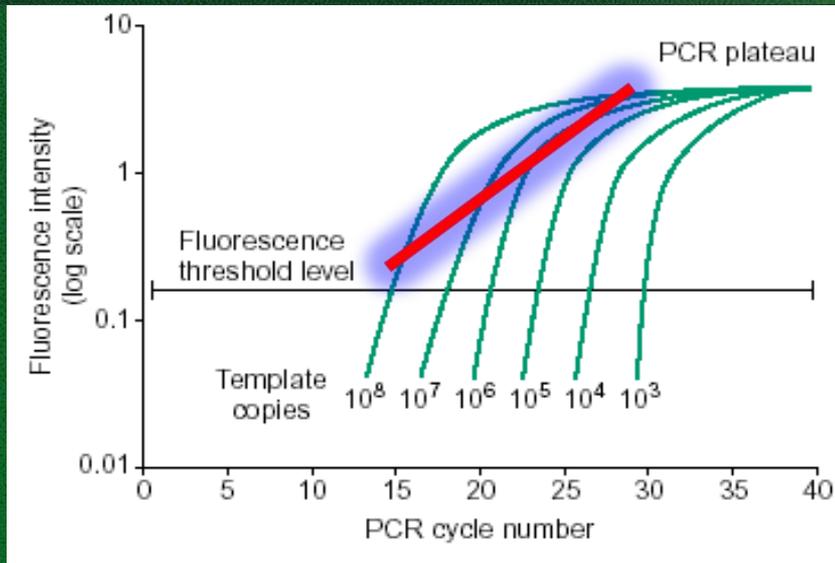
Custo dos sistemas químicos de detecção

| Detection Chemistries | Specificity | Multiplex Capability | Specific Oligonucleotide Required | Allelic Discrimination | Cost |
|---|---|----------------------|-----------------------------------|------------------------|--------|
| DNA Binding Dyes | Two PCR primers | No | No | No | \$ |
| Hybridization Probe Four Oligonucleotide Method | Two PCR primers; two specific probes | Yes | Yes | Yes | \$\$\$ |
| Hybridization Probe Three Oligonucleotide Method | Two PCR primers; one specific probe | Yes | Yes | Yes | \$\$\$ |
| Hydrolysis Probes | Two PCR primers; one specific probe | Yes | Yes | Yes | \$\$\$ |
| Molecular Beacons | Two PCR primers; one specific probe | Yes | Yes | Yes | \$\$\$ |
| Scorpions | One PCR primer; one primer/probe | Yes | Yes | Yes | \$\$\$ |
| Sunrise Primers | Two PCR primers | Yes | Yes | Yes | \$\$\$ |
| LUX Primers | Two PCR primers | Yes | Yes | No | \$\$ |

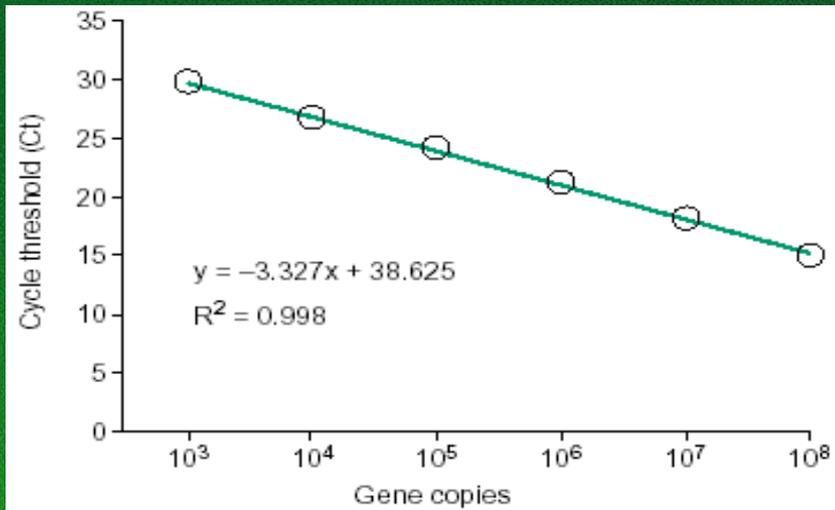
***, very expensive; **, moderately expensive; \$, inexpensive. LUX, light upon extension.

Considerações técnicas para implementação da (RT-)qPCR

- Métodos de quantificação
 - Escolha de uma curva padrão (Absoluta ou Relativa)
 - Eficiência de amplificação:
 $[10^{-1/\text{slope}}] - 1 = 1$
 - PCR não apresenta eficiência ideal
 - presença de inibidores; variabilidade nos nucleotídeos



Curvas de amplificação:
- relação do sinal fluorescente versus o número de ciclos da PCR



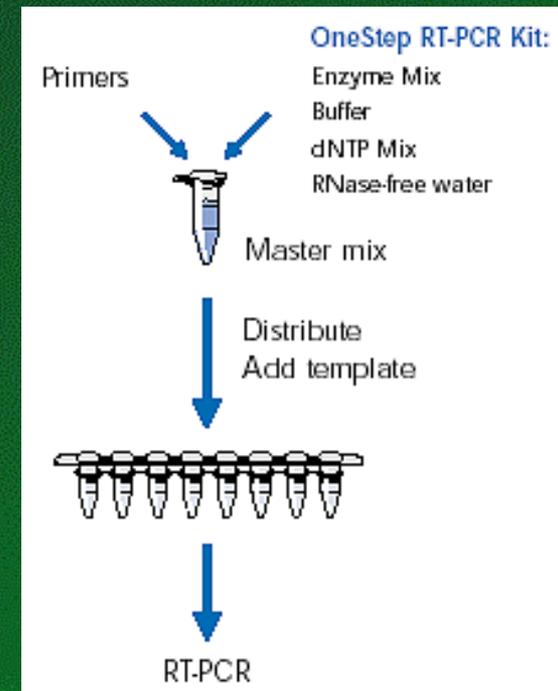
Curva padrão:
- R^2 = coeficiente de regressão linear dos dados é gerada
- cálculo da EA

Fonte: Mocellin et al., TRENDS in Molecular Biology., 2003

Considerações técnicas para implementação da (RT-)qPCR

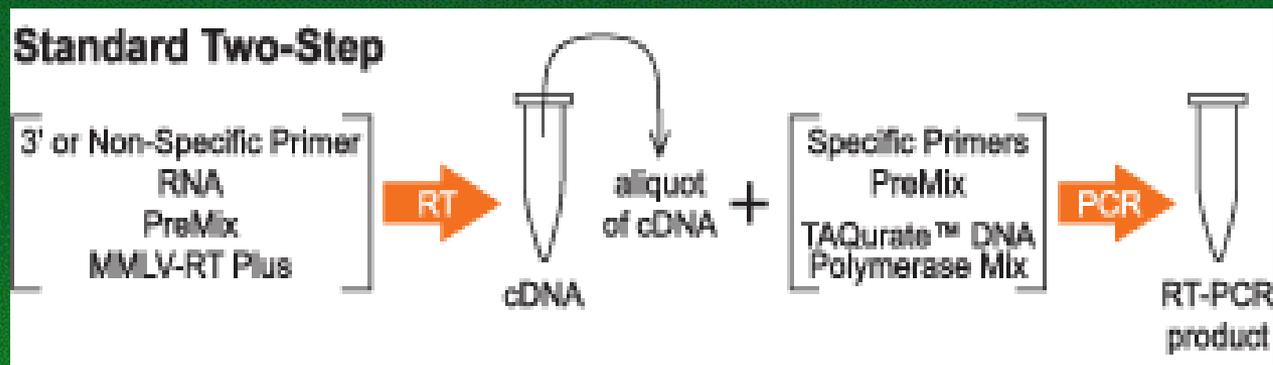
■ RT-qPCR

- Única ou duas etapas
 - Única etapa – única tubo
 - menor risco de contaminação do DNA
 - minimiza o risco de variação experimental
 - maior degradação do RNA



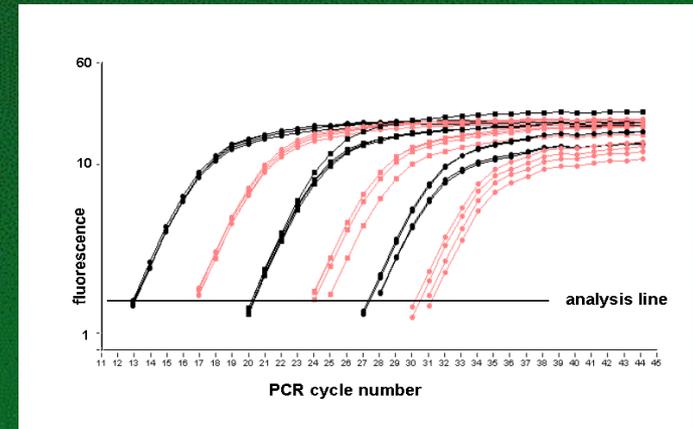
Considerações técnicas para implementação da (RT-)qPCR

- RT-qPCR
 - Duas etapas – RT independente da qPCR
 - Melhor quando a mesma amostra de RNA é utilizada



Considerações técnicas para implementação da (RT-)qPCR

- Variações experimentais da RT-qPCR
 - Técnica de alta sensibilidade
 - Variabilidade nos resultados
 - Triplicatas (RNA; cDNA ou DNA)



Considerações técnicas para implementação da (RT-)qPCR

- Controles
 - Devem ser incluídos para avaliar a contaminação do alvo (DNA, eficiência da RT, variações no M Mix)
 - Controle negativo (contaminado com não-alvo)
 - Controle positivo (contaminado com o alvo)
 - Branco (água)
 - ≥ 96 amostras (vários Brancos)
 - IAC: possibilita identificar substâncias inibidoras da PCR

Considerações técnicas para implementação da (RT-)qPCR

- Modo de expressão
 - Quantificação absoluta
 - UFC/mL ou GEq/mL (GEq ou cópias DNA/mL)
 - GE/mL = nr. de cópias do gene alvo
 - Diferenças entre UFC/GEq (células mortas, lise incompleta)
 - Quantificação relativa
 - Nível de expressão (gene, RNAr) da amostra para amostra controle
 - cDNA alvo/DNA espécie alvo

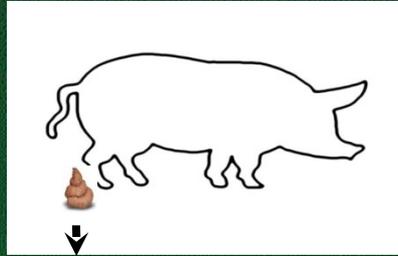
Aplicações da qPCR



Desenvolvimento de um ensaio para quantificação de *Salmonella* empregando a qPCR

- Fröder et al. 2008
 - 13 suínos (4 semanas de idade) oramente contaminados com *S. Typhimurium* DT 104
 - Dose Infectiva: $\sim 6 \times 10^9$ UFC/mL/animal
 - Material fecal colhido geralmente nos dias 1, 2, 3, 4, 6, 8, 13, 15, 20, 22 e 28 após infecção





Fezes coletadas via retal

Quantificação por qPCR

Quantificação por método

Tratamento Pré-PCR (200-220 mg de

clássico
Diluição 1:10 em 1% BPW

fezes)
Ensaio qPCR

Semeadura superficial 100 µL sobre XLD^{NaI50} com SP



Incubação (48 h /37°C)



Contagem bacteriana automática (ProtoCOL)

Confirmação sorológica

Protocolo para quantificação de *Salmonella* em material fecal

Protocolo para quantificação de *Salmonella* em fezes suínas por qPCR

QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen)

Material: 200-220 mg

Ensaio qPCR:

Malorny et al. Diagnostic real-time PCR for detection of *Salmonella* in food. AEM, 2004

Fragmento de 94 pb do locus *ttr* específico para *Salmonella*

Sonda TaqMan FAM-DQ

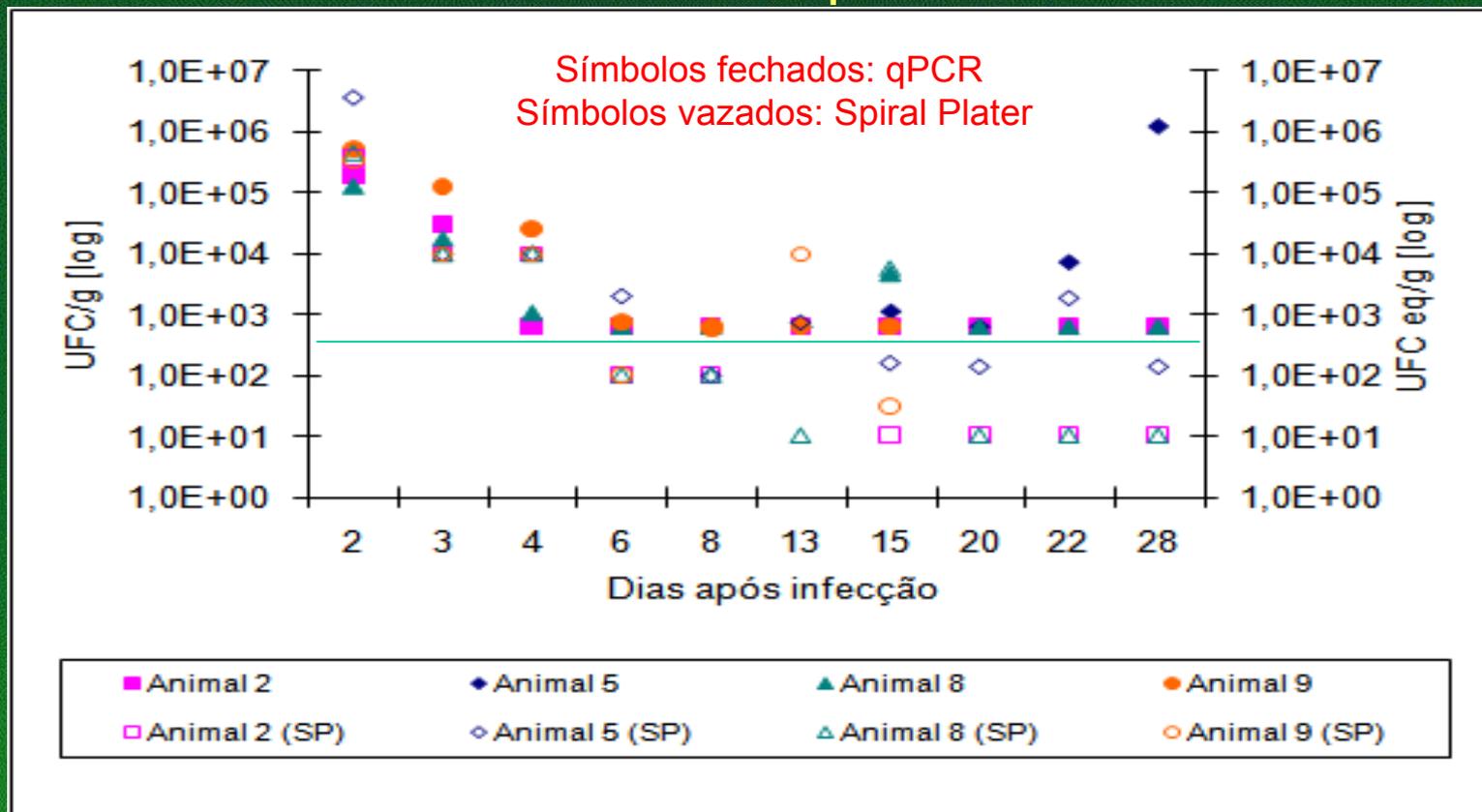
Curva Padrão:

1 – 10⁷ células direto na qPCR

6,5 x 10⁵ – 6,5 cópias de DNA (após Qiagen Kit)

Análise dos dados baseado no valor C_i

Quantificação de *Salmonella* em fezes suínas naturalmente contaminadas empregando método clássico e qPCR



Valores médios de UFC eq de *Salmonella* e C_t médios obtidos para as curvas padrão de fezes naturalmente contaminadas e submetidas ao qPCR, após tratamento com QIAamp[®] DNA Stool Kit

| <i>Salmonella</i> (UFC/mL ± DP) [■] | <i>Salmonella</i> qPCR (UFC eq) [▲] | <i>Salmonella</i> (UFC eq) [□] | C _t ± DP* |
|---|--|---|----------------------|
| 1,3 × 10 ⁸ ± 1,5 × 10 ⁷ | 6,5 × 10 ⁵ | 9,3 × 10 ⁵ ± 6,1 × 10 ⁴ | 18,8 ± 0,33 |
| 1,3 × 10 ⁷ ± 1,5 × 10 ⁶ | 6,5 × 10 ⁴ | 1,1 × 10 ⁵ ± 2,6 × 10 ⁴ | 22,1 ± 0,16 |
| 1,3 × 10 ⁶ ± 1,5 × 10 ⁵ | 6,5 × 10 ³ | 8,0 × 10 ³ ± 1,7 × 10 ³ | 25,3 ± 0,18 |
| 1,3 × 10 ⁵ ± 1,5 × 10 ⁴ | 6,5 × 10 ² | 9,9 × 10 ² ± 1,0 × 10 ² | 28,8 ± 0,40 |
| 1,3 × 10 ⁴ ± 1,5 × 10 ³ | 6,5 × 10 ¹ | 1,1 × 10 ² ± 2,9 × 10 ¹ | 31,9 ± 0,38 |
| 1,3 × 10 ³ ± 1,5 × 10 ² | 6,5 × 10 ⁰ | 9,6 × 10 ⁰ ± 1,4 × 10 ⁰ | 35,4 ± 0,59 |
| 1,3 × 10 ² ± 1,5 × 10 ¹ | 0,65 | 0,65 | > 45 |

■ população de *Salmonella* obtida no ágar XLD ^{Nal50} ± desvio padrão (DP)

▲ população de *Salmonella* em UFC eq definida na janela de detecção da PCR-RT

□ população de *Salmonella* em UFC eq obtida por PCR-RT

*C_t - ciclos da PCR cujo sinal fluorescente atingiu o limiar de detecção ± desvio padrão (DP)

APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Aug. 2010, p. 5097–5104
0099-2240/10/\$12.00 doi:10.1128/AEM.00411-10
Copyright © 2010, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Vol. 76, No. 15

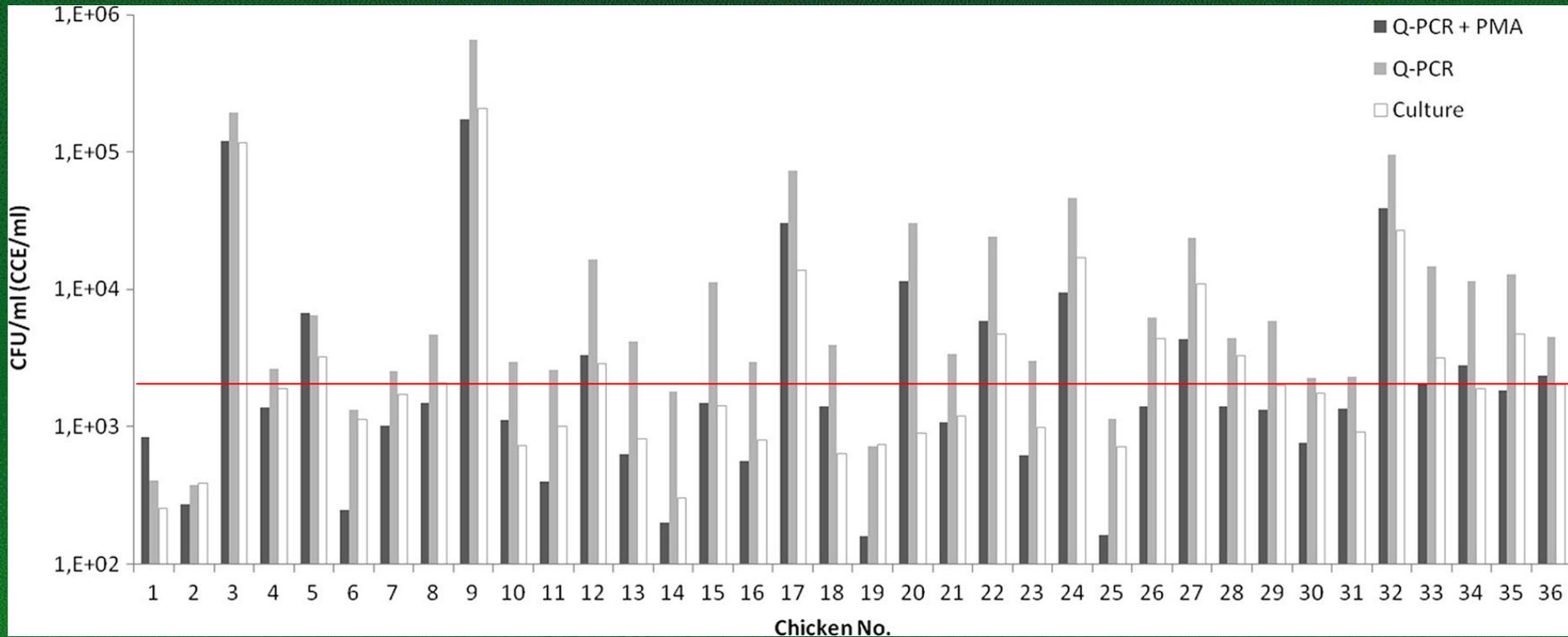
Rapid Quantification of Viable *Campylobacter* Bacteria on Chicken Carcasses, Using Real-Time PCR and Propidium Monoazide Treatment, as a Tool for Quantitative Risk Assessment^{∇†}

M. H. Josefsen,^{1*} C. Löfström,¹ T. B. Hansen,¹ L. S. Christensen,¹ J. E. Olsen,² and J. Hoorfar¹

National Food Institute, Technical University of Denmark, Mørkhøj Bygade 19, 2860 Søborg, Denmark,¹ and Department of Veterinary Disease Biology, Faculty of Life Sciences, University of Copenhagen, Stigbøjlen 4, 1870 Frederiksberg C, Denmark²

Combinação de qPCR; qPCR-PMA; tradicional
PMA: corante que intercala na dupla fita de células mortas
n= 50 carcaças naturalmente contaminadas
Método PMA-PCR: 100% de especificidade

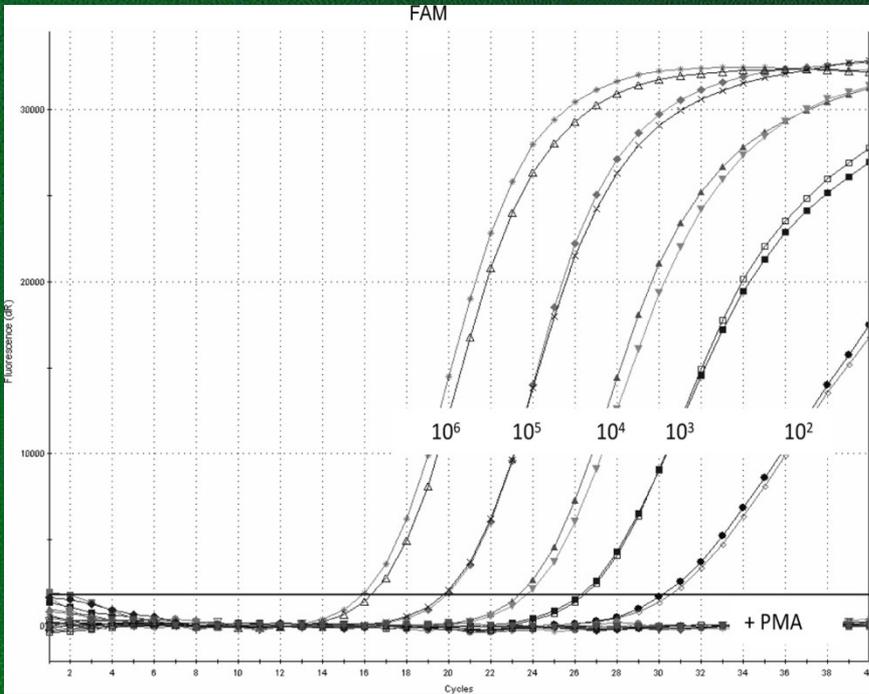
Método ISO 10272-1: trabalhoso, requer muito tempo, não detecta VPNC



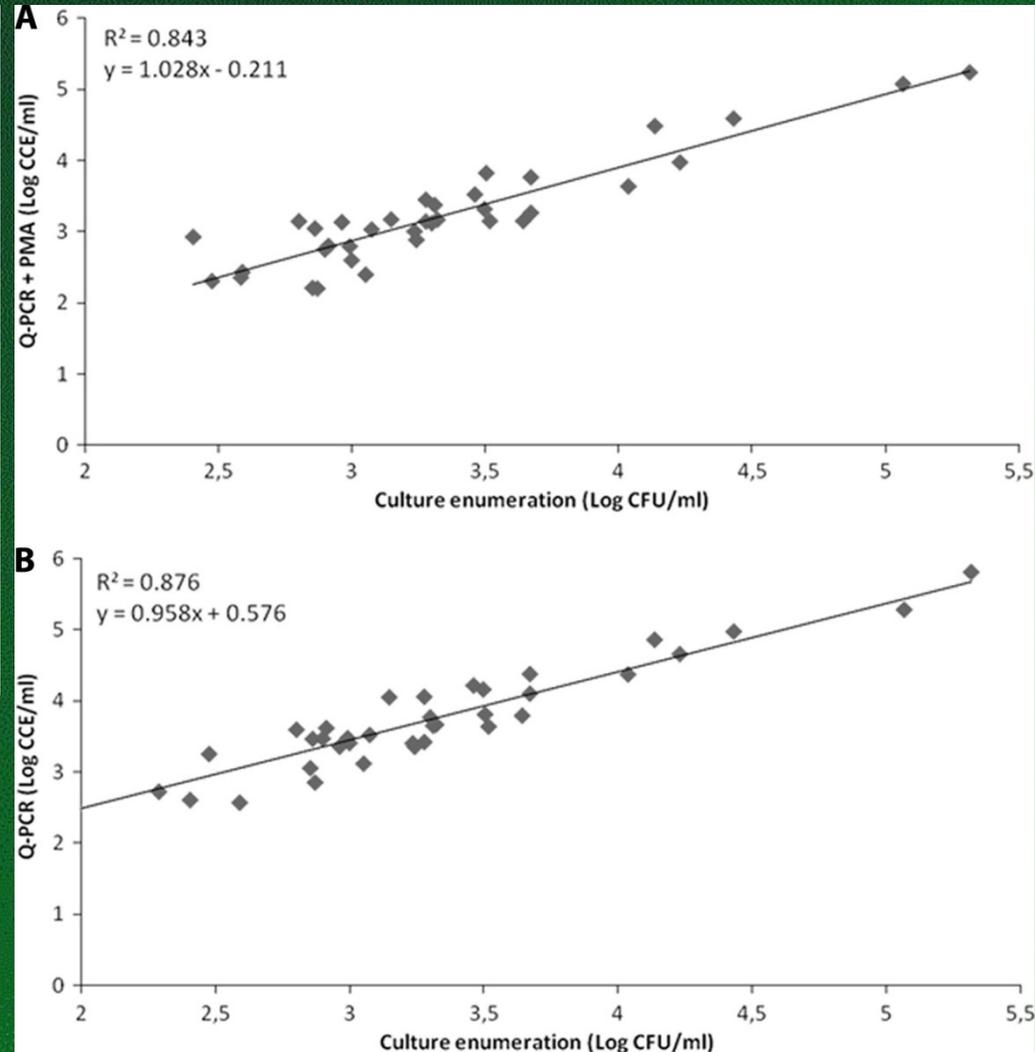
Resultados de qPCR (preto), qPCR com tratamento PMA (cinza) e o método tradicional (branco)

Correlação entre ISO e qPCR foi maior do que a correlação com qPCR-PMA

Considerações do qPCR-PMA: estado celular (viva ou morta), permeabilidade da parede celular ou se PMA entrou em pequenas frações em células cultiváveis



Limite de quantificação
qPCR e qPCR-PMA
 10^2 UFC/mL



**REAL-TIME REVERSE TRANSCRIPTION PCR DETECTION OF
VIABLE SHIGA TOXIN-PRODUCING *ESCHERICHIA COLI*
O157:H7 IN FOOD**

R. DI¹ and N.E. TUMER

*Biotechnology Center for Agriculture and the Environment
School of Environmental and Biological Sciences
Rutgers University
New Brunswick, NJ 08901-8520*

Primers para detecção de genes de virulência e sorotipo de *E. coli* O157:H7

RNA bacteriano em concentrações de 10^2 e 10^3 UFC

Inoculação artificial em suco, alface e carne

Concentração do inóculo empregando 2 filtrações (0,45 μm e 0,2 μm)

Tempo analítico: 4 h

| Primer name | Sequence (5' → 3') | |
|-----------------|--------------------------|--------------------------|
| stx1F | TCGCGAGTTGCCAGAATG | |
| stx1R | TTCATCTGCCGGACACAT | |
| stx2F | TCTGTTCGCGCCGTGAAT | |
| stx2R | GGCCTGTGCGCCAGTTATCTG | |
| eaeAF | AGCGGATAACGCCGATACC | → Proteína intimina |
| eaeAR | GCCTGAGCTACCCCATTCTTT | |
| fliCF | TCCATCGACAAATTCCGTTCT | → Antígeno flagelar H7 |
| fliCR | GCGGAATCCAGACGGTTCT | |
| hlyAF | TGCAAGTGCGGGTCTGATC | → Hemolisina |
| hlyAR | AGCCAGGAAAGAAAGAGGACTGA | |
| rfbEF | GATGCCAATGTACTCGGAAAAAT | |
| rfbER | CCACGCCAACCAAGATCCT | → Antígeno somático O157 |
| 16SF | GGCAGTCAGAGGCGATGAAG | → Controle interno |
| 16SR | TTCATATCACCTTACCGACGCTTA | |
| stx2 6FAM probe | AAGAGAGTCAACCAGAATG | |

DETECTION OF VIABLE *ESCHERICHIA COLI* O157:H7 (ATCC 43895) IN LETTUCE, GROUND BEEF AND APPLE JUICE USING BACTERIAL RNA ISOLATED FROM THE INOCULATED SAMPLES BY REAL-TIME RT-PCR

| Sample | C_T values from RNA representing 1×10^3 cfu <i>E. coli</i> O157:H7 | | | | | | |
|-------------|---|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------------|
| | <i>stx1</i> | <i>stx2</i> | <i>eaeA</i> | <i>fliC</i> | <i>hlyA</i> | <i>rfbE</i> | 16S |
| ATCC 43895* | 26.6 ± 1.2 | 29.4 ± 1.0 | 28.6 ± 1.5 | 30.8 ± 0.9 | 27.6 ± 1.4 | 27.8 ± 1.6 | 20.7 ± 1.4 |
| Control† | 29.5 ± 2.1‡ | 28.9 ± 1.9 | 29.8 ± 1.6 | 31.9 ± 2.3 | 29.7 ± 1.8 | 30.1 ± 3.1 | 18.5 ± 1.7 |
| Apple juice | 34.4 ± 2.6 | 30.2 ± 2.3 | 33.6 ± 1.2 | 33.1 ± 1.9 | 32.0 ± 1.7 | 33.1 ± 2.9 | 23.6 ± 2.5 |
| Lettuce | 35.1 ± 2.7 | 30.5 ± 3.0 | 34.8 ± 2.2 | 33.5 ± 1.6 | 32.4 ± 1.9 | 33.4 ± 2.1 | 25.4 ± 3.2 |
| Ground beef | 36.0 ± 2.7 | 31.7 ± 2.8 | 39.6 ± 3.0 | 34.5 ± 1.6 | 32.7 ± 1.7 | 34.6 ± 1.5 | 30.3 ± 2.8 |

| Sample | C_T values from RNA representing 1×10^2 cfu <i>E. coli</i> O157:H7 | | | | | | |
|-------------|---|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------------|
| | <i>stx1</i> | <i>stx2</i> | <i>eaeA</i> | <i>fliC</i> | <i>hlyA</i> | <i>rfbE</i> | 16S |
| ATCC 43895* | 31.7 ± 1.7 | 31.0 ± 2.0 | 31.9 ± 1.6 | 31.0 ± 1.9 | 32.2 ± 1.4 | 33.8 ± 2.1 | 21.1 ± 1.8 |
| Control† | 33.5 ± 2.8 | 32.8 ± 3.1 | 33.9 ± 2.7 | 34.8 ± 2.8 | 32.5 ± 1.5 | 33.0 ± 2.7 | 22.5 ± 2.4 |
| Apple juice | 37.0 ± 1.5 | 32.8 ± 2.6 | 36.2 ± 1.9 | 35.1 ± 2.7 | 33.4 ± 2.9 | 34.2 ± 3.1 | 25.8 ± 1.6 |
| Lettuce | 35.8 ± 3.1 | 32.6 ± 2.7 | 37.5 ± 2.5 | 35.2 ± 2.4 | 33.6 ± 2.6 | 34.8 ± 2.9 | 26.2 ± 1.9 |
| Ground beef | 37.0 ± 2.5 | 34.2 ± 2.9 | ND§ | 34.9 ± 1.8 | 33.2 ± 1.8 | 34.8 ± 2.4 | 31.4 ± 2.1 |

* ATCC 43895 is the sample of which bacterial RNA was isolated from the pure culture.

† Control is the sample in which *E. coli* O157:H7 ATCC 43895 was inoculated into 50 mL sterile water and concentrated by the two-step filtering technique.

‡ Real-time RT-PCR assay was repeated three times. The averaged C_T values are shown with the standard deviations for each sample.

§ ND means non-detectable after 40 cycles.

Diagnostic Real-Time PCR for Detection of *Salmonella* in Food

Burkhard Malorny,^{1*} Elisa Paccassoni,² Patrick Fach,³ Cornelia Bunge,¹
Annett Martin,¹ and Reiner Helmuth¹

*Federal Institute for Risk Assessment, Berlin, Germany*¹; *Department of Food Science, Alma Mater Studiorum, University of Bologna, Bologna, Italy*²; and *Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments, Maisons-Alfort, France*³

Validação *in-house* para detecção específica de *Salmonella* em alimentos

Validação requer: desenho de *primers* e sonda específicos

Teste de inclusividade e exclusividade

110 alimentos artificialmente contaminados

TABLE 2. Primers, probes, and IAC sequence used for the *Salmonella*-specific assay

| Designation | Sequence ^c | Positions ^a | Melting temp (°C) ^b |
|----------------------|---|------------------------|--------------------------------|
| ttr-6 (forward) | CTCACCAGGAGATTACAACATGG | 4287–4309 | 57 |
| ttr-4 (reverse) | AGCTCAGACCAAAAGTGACCATC | 4359–4381 | 58 |
| Target probe (ttr-5) | FAM-CACCGACGGCGAGACCGACTTT-Dark Quencher | 4336–4356 | 68 |
| IAC probe | Yakima Yellow-CACACGGCGACGCGAACGCTTT-Dark Quencher | | 68 |
| IAC sequence | GACTCACCAGGAGATTACAACATGGCTCTTGCTGTGCATCATCGCAGAACATC <u>AAAGCGTTCGCGTCGCCGTGTGGGATGGTCACTTTGGTCTGAGCTAC</u> | | |

^a Positions correspond to Genbank accession no. AF282268.

^b Calculated with the Primer Express program (version 1.5) with the default settings.

^c The sequences marked in boldface type are the primer binding sites, and the underlined sequence is the reverse complement IAC probe binding site.

IAC: fragmento de DNA artificial e inserido em cada mistura de reação

TABLE 1. *Salmonella* and non-*Salmonella* strains used for selectivity real-time PCR tests and results

| <i>Salmonella</i> strains | | | | Non- <i>Salmonella</i> strains | | |
|---------------------------------|--------------------------------|----------------|---------------------|------------------------------------|----------------|---------------------|
| Serotype (subspecies) | Serogroup | No. of strains | Result ^b | Organism | No. of strains | Result ^b |
| Enteritidis (I) | D ₁ | 21 | + | <i>Campylobacter jejuni</i> | 2 | - |
| Typhimurium ^a (I) | B | 20 | + | <i>Campylobacter coli</i> | 2 | - |
| Hadar (I) | C ₂ -C ₃ | 3 | + | <i>Campylobacter lari</i> | 1 | - |
| Virchow (I) | C ₁ | 3 | + | <i>Citrobacter freundii</i> | 11 | - |
| Infantis (I) | C ₁ | 3 | + | <i>Citrobacter diversis</i> | 2 | - |
| Heidelberg (I) | B | 3 | + | <i>Enterococcus faecalis</i> | 3 | - |
| Newport (I) | C ₂ -C ₃ | 3 | + | <i>Enterobacter agglomerans</i> | 1 | - |
| Brandenburg (I) | B | 3 | + | <i>Enterobacter cloacae</i> | 3 | - |
| Saintpaul (I) | B | 3 | + | <i>Enterobacter aerogenes</i> | 2 | - |
| Agona (I) | B | 3 | + | <i>Escherichia coli</i> | 15 | - |
| Blockley (I) | C ₂ -C ₃ | 3 | + | <i>Hafnia alvei</i> | 3 | - |
| Bovismorbificans (I) | C ₂ -C ₃ | 3 | + | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 5 | - |
| Bredeney (I) | B | 3 | + | <i>Klebsiella oxytoca</i> | 1 | - |
| Derby (I) | B | 3 | + | <i>Listeria monocytogenes</i> | 1 | - |
| Dublin (I) | D ₁ | 3 | + | <i>Listeria innocua</i> | 2 | - |
| Livingstone (I) | C ₁ | 3 | + | <i>Listeria ivanovii</i> | 1 | - |
| Montevideo (I) | C ₁ | 3 | + | <i>Morganella morganii</i> | 1 | - |
| Paratyphi B (I) | B | 3 | + | <i>Proteus vulgaris</i> | 3 | - |
| 42:r:- ^a (II) | T | 2 | + | <i>Proteus mirabilis</i> | 2 | - |
| 9,12:zz39 (II) | D | 1 | + | <i>Providencia alcalifaciens</i> | 1 | - |
| 48:d:z6 (II) | Y | 1 | + | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 1 | - |
| 42:b:e,n,x,z15 (II) | T | 1 | + | <i>Serratia marcescens</i> | 1 | - |
| 30:1,z28:z6 (II) | N | 1 | + | <i>Shigella flexneri</i> 2a | 1 | - |
| 21:g,z51:- (IIIa) | L | 1 | + | <i>Shigella boydii</i> | 3 | - |
| 47:r:- (IIIa) | X | 1 | + | <i>Staphylococcus aureus</i> | 4 | - |
| 18:z4,z32:- ^a (IIIa) | K | 1 | + | <i>Yersinia enterocolitica</i> | 5 | - |
| 50:zz52 (IIIb) | Z | 1 | + | <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> | 2 | - |
| 47:1,v:z ^e (IIIb) | X | 1 | + | <i>Yersinia kristensenii</i> | 1 | - |
| 18:i,v:z (IIIb) | K | 1 | + | <i>Yersinia aldovae</i> | 1 | - |
| 16:z4,z32:- ^a (IV) | I | 1 | + | <i>Yersinia frederiksenii</i> | 1 | - |
| 48:g,z51:- (IV) | Y | 1 | + | <i>Yersinia bercovieri</i> | 1 | - |
| 11:z4,z23:- (IV) | F | 1 | + | <i>Yersinia rohdei</i> | 1 | - |
| 44:r:- (V) | V | 1 | + | <i>Yersinia mollaretii</i> | 1 | - |
| 66:z65:- ^a (V) | | 1 | + | <i>Yersinia intermedia</i> | 2 | - |
| 48:z35:- (V) | Y | 1 | + | | | |
| 45:a:e,n,x (VI) | W | 1 | + | | | |
| 1,6,14,25:a:e,n,x (VI) | H | 1 | + | | | |
| 41:b:1,7 (VI) | S | 1 | + | | | |
| Total no. of strains | | 110 | | Total no. of strains | 87 | |

^a *trBCA* regions sequenced. From the serovar Typhimurium strains, the *trBCA* region of reference strain 51K61 was sequenced (Genbank accession numbers AY578064 to AY578070).

^b +, positive test result; -, negative test result.

TABLE 3. Mean C_T , end-point fluorescence, and s_r of 10-fold serially diluted *Salmonella* DNA in the presence of 150 IAC copy numbers^b

| No. of <i>Salmonella</i> genome copies/PCR | Dye | | | |
|---|--------------------------------|--------------------------|----------------------------|--------------------------|
| | FAM (<i>Salmonella</i> probe) | | Yakima Yellow (IAC probe) | |
| | $C_T \pm s_r$ | $F_{\text{end}} \pm s_r$ | $C_T \pm s_r$ | $F_{\text{end}} \pm s_r$ |
| 10^6 | 19.76 ± 0.183 | 1.220 ± 0.157 | 25.64 ± 2.591 ^a | 0.099 ± 0.0203 |
| 10^5 | 23.58 ± 0.248 | 0.856 ± 0.114 | 29.71 ± 1.221 ^a | 0.089 ± 0.0122 |
| 10^4 | 26.51 ± 0.314 | 0.844 ± 0.113 | 30.72 ± 0.880 ^a | 0.136 ± 0.0229 |
| 10^3 | 29.84 ± 0.411 | 0.592 ± 0.084 | 31.60 ± 0.586 | 0.205 ± 0.0242 |
| 10^2 | 33.69 ± 0.560 | 0.343 ± 0.055 | 31.68 ± 0.558 | 0.229 ± 0.0179 |
| 10^1 | 38.40 ± 0.818 | 0.150 ± 0.032 | 31.79 ± 0.520 | 0.251 ± 0.0154 |
| 1 | 44.42 ± 1.327 | 0.041 ± 0.020 | 31.68 ± 0.558 | 0.263 ± 0.0225 |
| 0 | 45 ± 0 | 0.023 ± 0.018 | 31.90 ± 0.483 | 0.243 ± 0.0312 |

^a PCR growing curves did not show exponential increase and only low fluorescence values due to suboptimal amplification.

^b F_{end} , end-point fluorescence. The s_r is shown for four runs with three replicates each.

TABLE 5. Results of the real-time PCR-based method compared to the traditional culture method for detection of *Salmonella* in various food samples

| Type of sample | Total no. of samples | Traditional culture method (ISO 6579:2003) | | <i>Salmonella</i> real-time PCR | | Sensitivity (%) | Specificity (%) | Accuracy (%) |
|-------------------------|----------------------|--|-------------------------|---------------------------------|-------------------------------|-----------------|-----------------|--------------|
| | | No. of positive samples | No. of negative samples | No. of false-negative samples | No. of false-positive samples | | | |
| Fish fillets | 20 | 0 | 20 | 0 | 0 | 100 | 100 | 100 |
| Carcass rinses, chicken | 23 | 7 | 16 | 0 | 0 | 100 | 100 | 100 |
| Minced meat | 21 | 11 | 10 | 0 | 0 | 100 | 100 | 100 |
| Raw milk | 46 | 10 | 36 | 0 | 0 | 100 | 100 | 100 |
| Total | 110 | 28 | 82 | 0 | 0 | 100 | 100 | 100 |

Sensibilidade: número total de culturas ou colônias positivas corretamente obtidas

Especificidade: número total de culturas ou colônias negativas obtidas

Incorporation of Real-Time PCR into Routine Public Health Surveillance of Culture Negative Bacterial Meningitis in São Paulo, Brazil

Claudio T. Sacchi^{1*}, Lucila O. Fukasawa¹, Maria G. Gonçalves¹, Maristela M. Salgado¹, Kathleen A. Shutt², Telma R. Carvalhanas³, Ana F. Ribeiro³, Brigina Kemp⁴, Maria C. O. Gorla⁵, Ricardo K. Albernaz³, Eneida G. L. Marques⁶, Angela Cruciano⁷, Eliseu A. Waldman⁸, M. Cristina C Brandileone⁵, Lee H. Harrison², São Paulo RT-PCR Surveillance Project Team¹

Estudo de validação qPCR multiplex (12 hospitais de SP) e identificação de fatores associados com cultura negativas* e PCR positivas

Neisseria meningitidis, *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae* Tipo b causam meningite em recém nascidos
Brasil: 28.000 casos/ano

*devido uso de antibióticos

Características dos 499 pacientes envolvidos no estudo

| <u>Características</u> | <u>Nr. (%)</u> |
|---------------------------------------|----------------|
| Sexo masculino | 301 (60.9%) |
| Faixa etária média | 9 anos (0–82) |
| Mortos | 40 (9.6%) |
| Culture-positivo | |
| <i>N. meningitidis</i> | 107 (21.4%) |
| <i>S. pneumoniae</i> | 50 (10.0%) |
| <i>H. influenzae</i> | 5 (1.0%) |
| CSF \geq 100 WBCs e \geq 60% PMNs | 460 (93.7%) |
| Cultura positiva, 1 dos 3 alvos | 123 |
| Cultura negativa | 337 |
| Ensaio antibiótico CSF positivo | 142 (34.6%) |

CSF – Fluido cérebro-espinhal; WBC – células sanguíneas brancas; PMNs – células polimorfonucleares

Table 2. Determination of sensitivity and specificity of RT-PCR assay for *N. meningitidis* (*ctrA*), *S. pneumoniae* (*lytA*), and *H. influenzae* (*bexA*) in cerebrospinal fluid and serum specimens (see text for details).

| Pathogen | No.* | Sensitivity | 95% CIs | Specificity-Method 1** | | Specificity-Method 2, unadjusted*** | | Specificity-Method 2, adjusted**** | | No.* | 95% CIs | |
|----------------------------|------|-------------|-----------|------------------------|---------|-------------------------------------|---------|------------------------------------|-----------|-------|---------|-----------|
| | | | | No.* | 95% CIs | No. | 95% CIs | No. | 95% CIs | | | |
| CEREBROSPINAL FLUID | | | | | | | | | | | | |
| <i>N. meningitidis</i> | 90 | 100% | 96.0–100 | 100% | 51 | 93.0–100 | 75.7% | 342 | 70.8–80.2 | 98.9% | 262 | 96.7–99.8 |
| <i>S. pneumoniae</i> | 46 | 97.8% | 88.5–99.9 | 100% | 94 | 96.2–100 | 93.5% | 386 | 90.6–95.8 | 100% | 361 | 99.0–100 |
| <i>H. influenzae</i> | 3 | 66.7% | 9.4–99.2 | 100% | 139 | 97.4–100 | 99.8% | 433 | 98.7–100 | 100% | 432 | 99.2–100 |
| SERUM | | | | | | | | | | | | |
| <i>N. meningitidis</i> | 21 | 57.1% | 34.0–78.2 | 100% | 12 | 73.5–100 | 83.1% | 223 | 77.4–87.9 | 94.1% | 188 | 89.8–97.0 |
| <i>S. pneumoniae</i> | 10 | 80.0% | 44.4–97.5 | 100% | 25 | 86.3–100 | 96.2% | 235 | 92.9–98.2 | 100% | 226 | 98.4–100 |
| <i>H. influenzae</i> | 2 | 0% | 0–84.2 | 100% | 33 | 89.4–100 | 100% | 243 | 98.5–100 | 100% | 243 | 98.5–100 |

*Number of specimens contributing to the calculation of sensitivity or specificity

**Specificity determined using specimens positive for other organisms

***Specificity determined using specimens positive for other organisms or culture negative

****Specificity determined using specimens positive for other organisms or culture negative but positive for second gene target.

doi:10.1371/journal.pone.0020675.t002

Risco de cultura + qPCR = presença de antibióticos no fluido cérebro-espinal

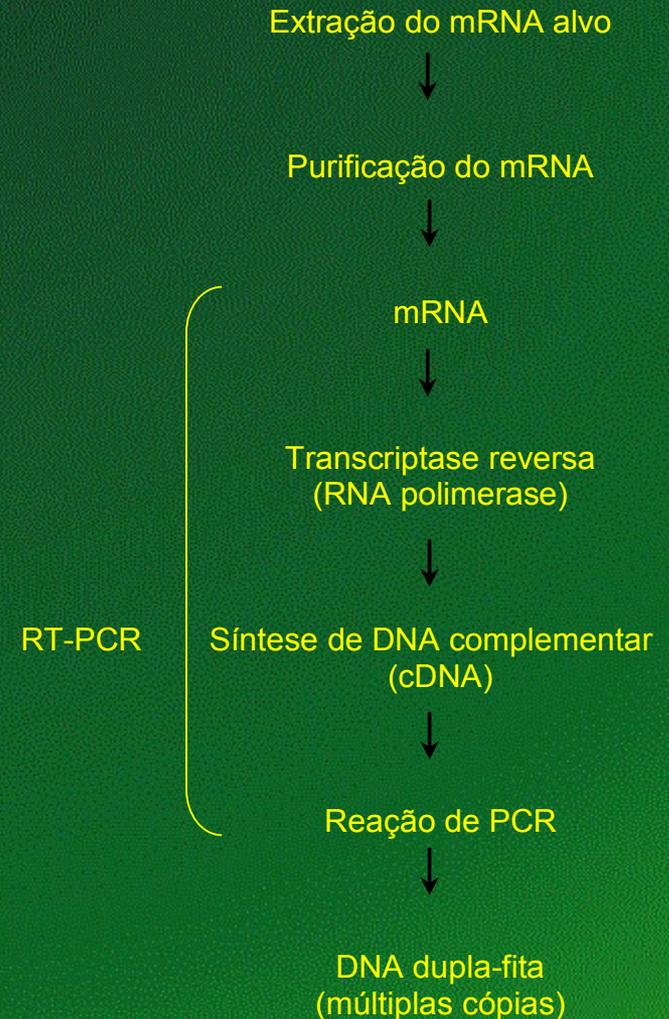
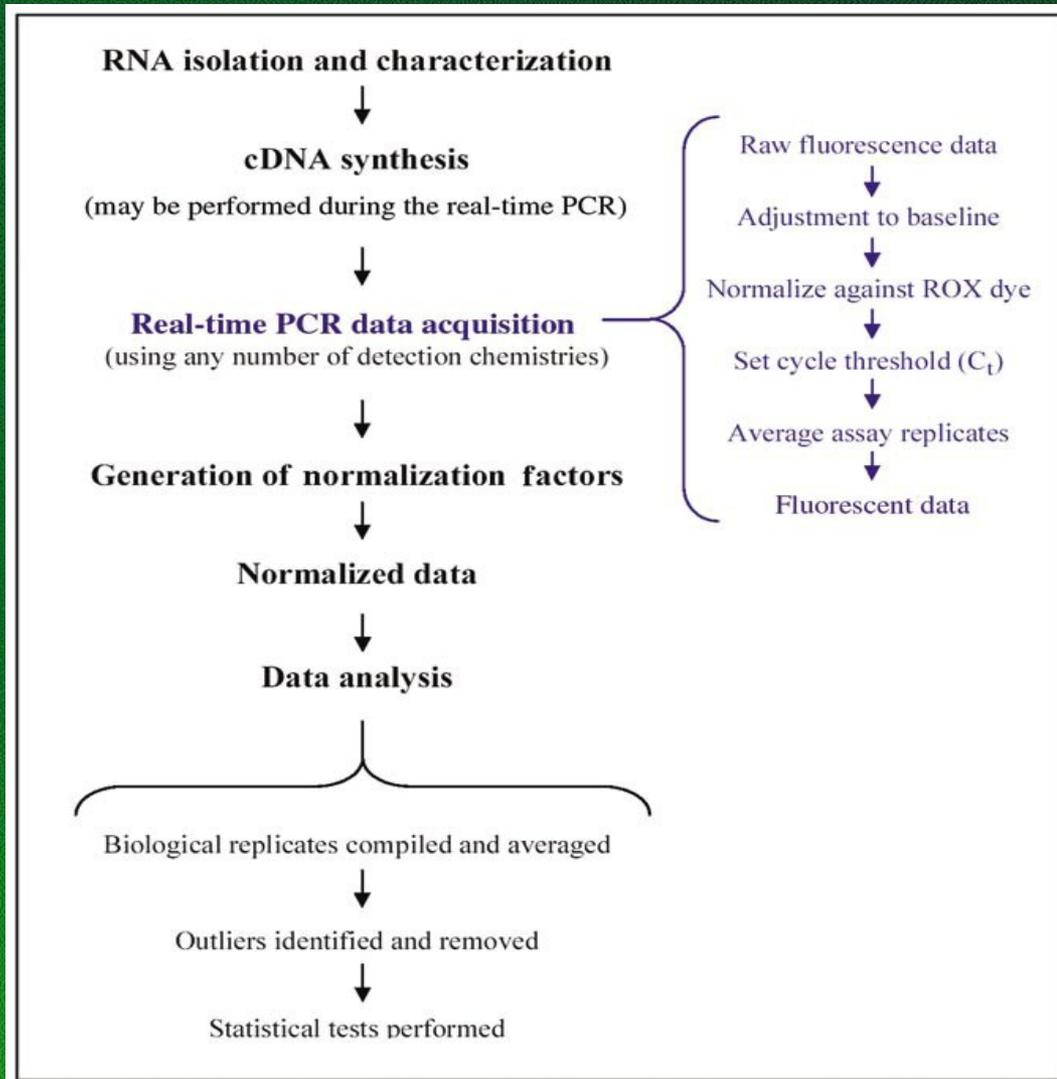
- Método 1** – cultura positiva para um patógeno e os outros dois negativos na qPCR
- Método 2*** – culturas negativas, com critério CSF de ≥ 100 leucócitos/mm³ e ≥ 60 neutrófilos
- Metodo 3**** – culturas positivas para o segundo alvo, porém removidas no cálculo da sensibilidade

Real-time PCR for mRNA quantitation

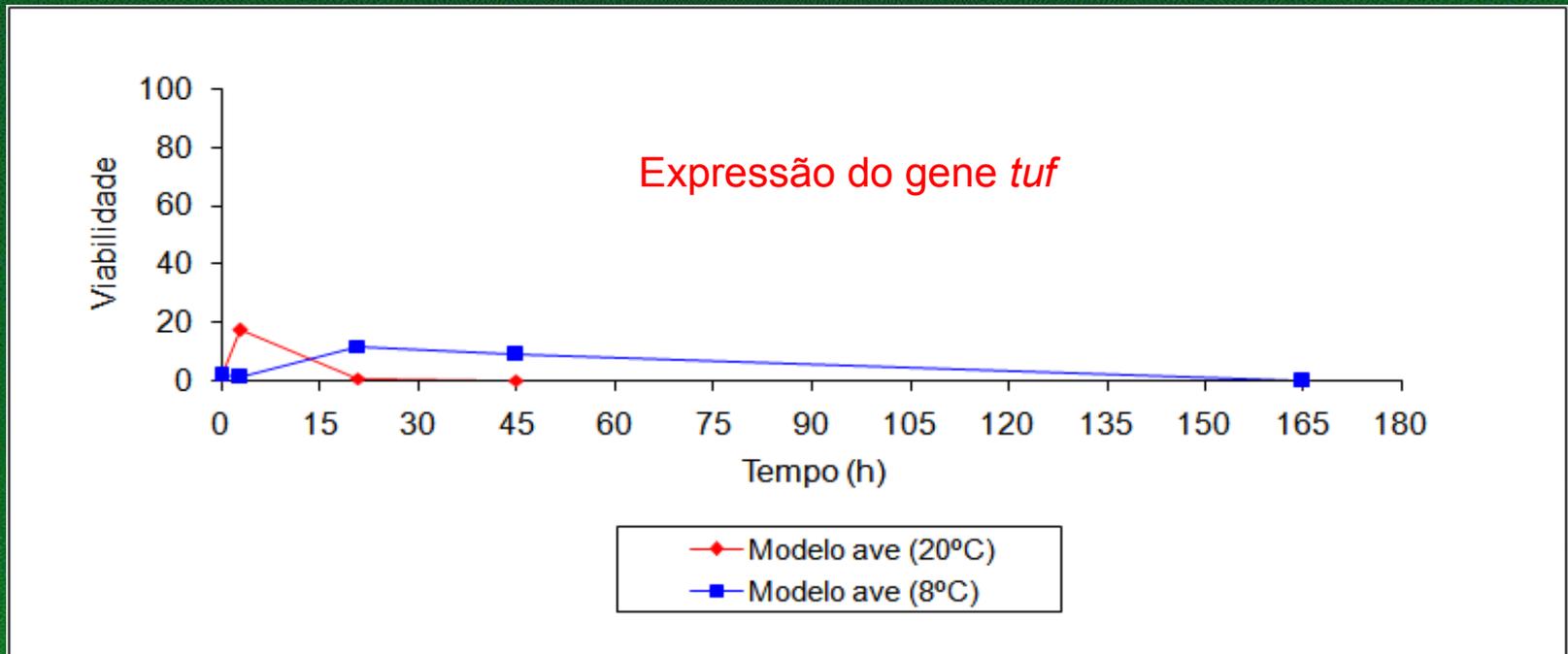
Marisa L. Wong and Juan F. Medrano

BioTechniques 39:75-85 (July 2005)

Única etapa – única tubo
Duas etapas – RT independente da qPCR
Emprego de duas enzimas (RT e DNA polimerase)
Quantificação absoluta ou relativa



Viabilidade obtida para *S. Typhimurium* 51K61 no modelo ave durante o período de 165 h após a inoculação



Viabilidade: relação cóp. RNA (UFC_{eq} do *tuf*-RNA) e cóp. DNA (UFC_{eq} *tuf*)
 Viabilidade: capacidade de metabolizar componentes

Aplicações da (RT-)qPCR na MA

- qPCR = detecção e quantificação (bactérias*, fungos e vírus)
 - **Salmonella*, *Lm*, *Sa*, *Ec* O157:H7
- Vantagens:
 - Tempo analítico menor
 - *Lm* (2 dias)
 - *Salmonella* (26 h ou algumas horas)
 - Clostrídios (1 dia)
 - *Bc* (2 h)

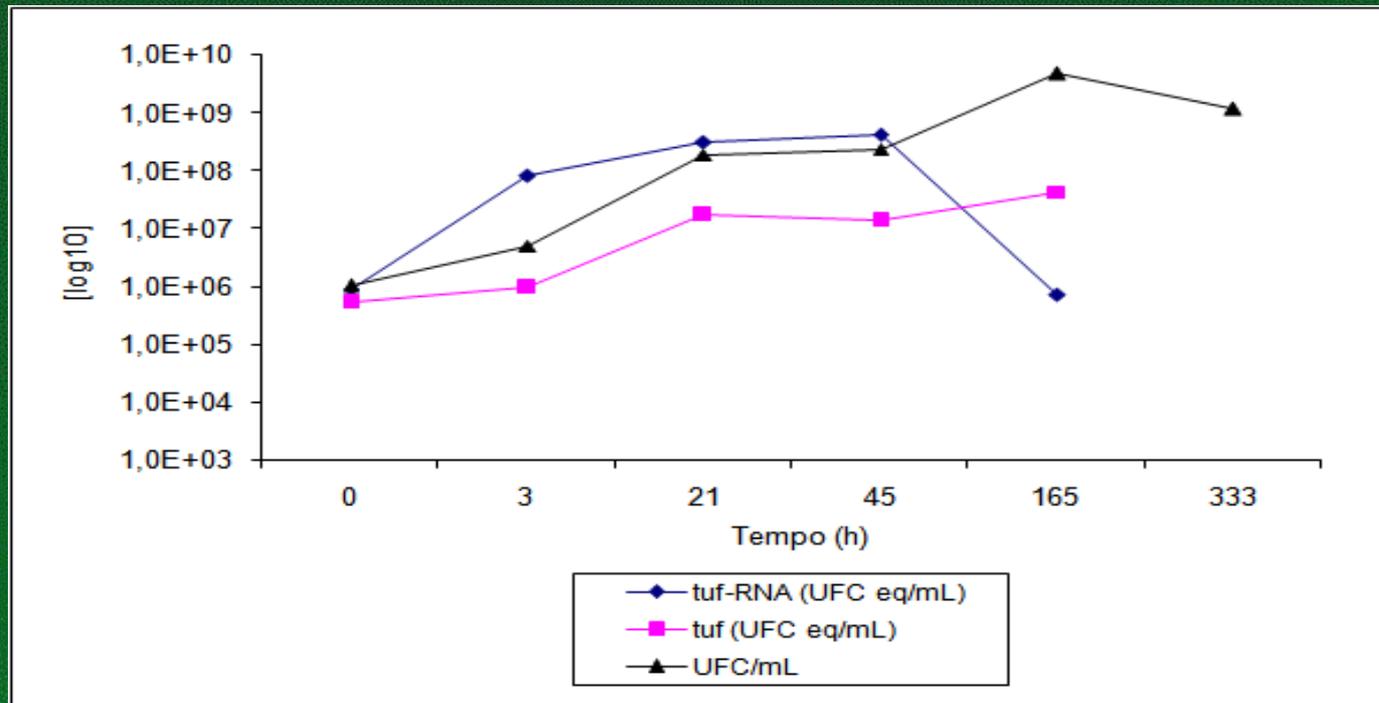
Aplicações da (RT-)qPCR na MA

- Ct similar às contagens em placa
- Limites de quantificação sem enriquecimento da amostra: $10^2 - 10^3$ UFC/g ou mL
- Ideal: qPCR + enriquecimento de poucas horas
 - *Salmonella* e *Lm* (<5 UFC/25 g)
 - *Salmonella* (18 h APT → extração + quantificação) = 100% concordância com a ISO 6579
 - *Lm* (24 h DF + 4 h F) = 1-5 UFC/25 g

Aplicações da (RT-)qPCR na MA

- Reduzir os níveis de detecção
 - Combinar :
 - PCR ou Filtração ou Centrifugação
 - 10-100 UFC/g (*Salmonella* e *C. jejuni*) em 3 h
 - Método: centrifugação por densidade + qPCR
 - qPCR: correlação com plaqueamento (5 logs)
 - Discrepâncias: contagens maiores no plaqueamento

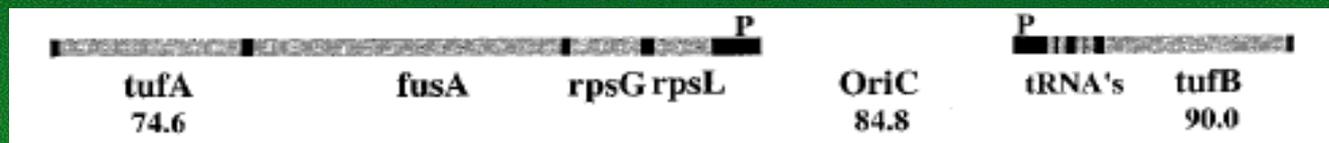
Discrepância de logs



Populações médias de *S. Typhimurium* obtidas em alimento-modelo (suíno) incubado a 20 °C e determinada por RT-qPCR (*tuf*-RNA), qPCR- (*tuf*) e semeadura em ágar XLD

Aplicações da (RT-)qPCR na MA

- Motivos das discrepâncias:
 - Volumes diferentes (1 mL ou 0,1 mL versus 5 μ L)
 - Presença de DNA intacto de células mortas
 - Presença de formas VPNC
 - 1 UFC pode ser gerada por mais uma célula
 - Uso de *primers* para o alvo variando números de multicópias dos genes



Aplicações da (RT-)qPCR na MA

- Quantificação de patógenos:
 - Considerar <LQ do alimento (não o <LQ da cultura pura)
 - Eficiência da extração
 - Interações do alimentos com os componentes da PCR
- Alvos usados: 16 S rRNA, 23 S rRNA
- Genes *housekeeping*: virulência ou metabolismo
 - *Salmonella*: genes da invasina (*invA*)
 - *S. aureus*: genes da nuclease (*nuc*)

Aplicações da (RT-)qPCR na MA

- Tendência atual: *multiplex* no mesmo tubo de reação
 - Diferencia rapidamente de gênero ou espécie
 - Exemplos:
 - *E.coli* O157:H7, *Salmonella* spp., *Lm* presente em leite e carne
 - *Campylobacter*, *Salmonella* spp. em frango

qPCR: detecção de não-patogênicos

- Detecção e quantificação de bactérias
 - processos fermentativos (LAB)
 - Propriedades organolépticas
 - Queijo – *Enterococcus gilvus* (LD:10⁴ UFC/g)
 - Queijo – *Corynebacterium casei* (LQ: 10⁵ UFC/g)
 - Probióticos – *Bifidobacterium* (LD: 10² UFC/g) (16 rRNA)

- qPCR: monitoramento de alterações causadas por fungos (maturação de queijos)
 - *Penicillium roqueforti*
 - *Penicillium camemberti*

qPCR: detecção de não-patogênicos

- Limitações do qPCR: substituídas pelo RT-qPCR
- RT-qPCR: pouco usado
 - Dificuldade na extração de RNA
 - Disponibilidade de *kits*
 - Instrumentos (*ready-to-use*) checagem de RNA integral

RT-qPCR e avaliação de risco

- Problemas recorrentes
 - Métodos moleculares: detecção de micro-organismos mortos

- Estratégias de diferenciação de cél.viável/mortas
 - EMA/PMA (aplicado antes da extração de DNA)
 - inativação da célula viável e inibição da PCR
 - Inclusão da etapa de enriquecimento
 - Sistemas de filtração
 - Tratamento com DNase I (viável e esporos)

Conclusão e Recomendações

- Detecção e quantificação de patógenos estão sendo amplamente estudados na MA
- Resultado positivo pelo método rápido será considerado presuntivo e deverá ser confirmado pelo tradicional
- A confirmação estende a análise por vários dias, isso não pode ser visto como fator limitante (devido a ter negativos)

Conclusão e Recomendações

- Métodos rápidos carecem de sensibilidade e especificidade para análise direto do alimento
- Enriquecimento considerado um fator limitante (Temp), porém dilui os efeitos dos inibidores, diferencia viáveis de VPNC, reparo do stress ou injúria celular
- Tendência de uso do qPCR multiplex
 - Múltipla detecção / análise de rotina

Conclusão e Recomendações

- Falta consenso de como conduzir os experimentos e interpretar dados
- Exemplo: há muitos métodos qPCR para *E. coli* O157:H7 e *Salmonella* que poderão:
 - Confundir e ser massacrante para o usuário
 - Qual validar?

Conclusão e Recomendações

- Devido a alta sensibilidade do (RT-)qPCR pequenas diferenças no preparo de amostra, amplificação e expressão dos dados tem impacto nos resultados
- Inclusão de vários controles em cada etapa
- SYBR Green é o corante mais barato, apresenta um resultado robusto e sensível

Conclusão Final

- Estudos futuros:
 - Estudos envolvendo diferentes etapas de processos industriais
 - Expressão dos genes do alvo de interesse
 - Buscar a melhoria no limite de detecção, a fim de se obter maior sensibilidade do método

Opinião Pessoal

- Devido a complexidade do método (RT-)qPCR, deve se levar sempre em consideração:
 - Custo dos reagentes/*kits*
 - Necessidade de haver pessoal técnico especializado para a realização do trabalho
 - Resultado em curto período de tempo
 - Método simples
 - Sensível para detectar baixos níveis de micro-organismos e preciso

Referências

- BAM online: Rapid methods for detecting foodborne, 2001
- Castelani, L. & Duarte, K. M. R. Métodos moleculares em microbiologia de alimentos, PUBVET, 5 (2), 2011
- Destro, M.T. *Listeria* em camarão (*Penaeus brasiliensis*): marcadores sorológicos e genéticos no monitoramento de sua disseminação em uma unidade processadora de pescado, 1995. (Tese de Doutorado)
- Di, R & Tumer, N.E. Real-time reverse transcriptase for detection of shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 in food, J. Food Safety, 30, 51-66, 2010
- Farber, J.M. et al. Rapid methods for detection, identification, and enumeration. Chapter 10, 11.6 Rapid PCR-Based Methods. APHA, 2001
- Fröder, H. Desenvolvimento de métodos para a quantificação direta de *Salmonella* sp. por PCR-tempo real e por transcriptase reversa-PCR-tempo real, 2008. (Tese de doutorado)
- Gandra, E.A. et al. Técnicas moleculares aplicadas à microbiologia de alimentos, Acta Sci. Technol., 30 (1), 109-118, 2008

Referências

- Josefsen, M. H. et al. Rapid quantification of viable *Campylobacter* bacteria on chicken carcasses, using real-time PCR and propidium monoazide treatment, as a tool for quantitative risk assessment. AEM, 76 (15), 5097-5104, 2010
- Malorny, B. et al. Diagnostic real-time PCR for detection of *Salmonella* in food, AEM, 70(12), 7046-7052, 2004
- Mocellin et al. TRENDS in Molecular Biology, 2003
- Novais, C.M. & Pires-Alves, M. PCR em tempo real, Rev. Biotec. Ciên & Desenvol., 33, 2004
- Postollec, F. et al. Recent advances in quantitative PCR (qPCR) applications in food microbiology. Food Microbiology, 28, 848-861, 2011
- Sacchi, C. et al. Incorporation of Real-time PCR into routine public health surveillance of culture negative bacterial meningitidis in Sao Paulo, Brazil, Plos ONE, 6 (6), 2011
- Valasek, M. & Repa, J. J. The power of real-time PCR. Adv. Physiol. Edu, 2005
- Wong, M. L. & Medrano. J. Real-time PCR for mRNA quantification, BioTechniques, 39:75-85, 2005



"Ora a fé é o firme fundamento das coisas que se operam e uma demonstração das que não se veem"

Hebreus 11,1

SFDK

Análises e Controle de Processos

Muito Obrigado!

Hans Fröder

hfroder@hotmail.com

(011) 5097 7888

