

PCR MULTIPLEX EM TEMPO REAL PARA A IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE *Staphylococcus* COAGULASE-POSITIVA

BRUNA GAROFALI SIMONE DRABER¹; DIAGO DUTRA LIMA²; PEDRO MACHADO MEDEIROS DE ALBUQUERQUE³; NATÁLIA MACHADO RAHAL⁴; NATACHA DEBONI CERESER⁵; RODRIGO CASQUERO CUNHA⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – bruna.draber@gmail.com

² Universidade Federal de Pelotas – diagolima@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – albuquerquepedro95@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – rahal.natalia@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – natchacereser@gmail.com

⁶ Universidade Federal de Pelotas – rodrigocunha_vet@hotmail.com

1. INTRODUÇÃO

O Gênero *Staphylococcus* spp. compreende cocos Gram-positivos, não esporulados e anaeróbicos facultativos. Esses microrganismos são cosmopolitas e formadores de biofilme, integrando a microbiota da pele, glândulas e mucosas de mamíferos (MCMILLAN et al., 2016). Esses microrganismos podem causar diversas infecções, como por exemplo mastite, dermatite, entre outras. Também são responsáveis por causar intoxicação alimentar, onde toxinas produzidas por *Staphylococcus* spp. são ingeridas juntamente com alimentos (ZHANG et al., 2022). Diversas enfermidades causadas por bactérias têm consequências graves, podendo levar até a óbito, principalmente por cepas multirresistentes (BEZERRA, 2020).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é a ferramenta base da biologia molecular, sendo utilizada frequentemente em diversos estudos e diagnósticos ao longo do tempo (THAMMASITTIRONG, 2019). A PCR consiste na ampliação de segmentos específicos do DNA, que tem como principal característica a capacidade de produção exponencial em poucas horas. Foi desenvolvida em 1983 e descrita em 1990 por Kary Mullis. Possui as seguintes etapas: desnaturação, anelamento e extensão, realizadas em ciclos de temperaturas, sendo repetidos em média de 30 a 40 vezes. Na desnaturação, ocorre a quebra de pontes de hidrogênio nas bases nitrogenadas, no anelamento ocorre a ligação entre o primer e a molécula de DNA alvo e na extensão ocorre a síntese da nova fita de DNA (polimerização). A variação de temperatura entre as etapas depende da sequência do primer e da fase de extensão na qual as ligações permitem a enzima sintetize a fita complementar (LIU et al., 2020).

A PCR em tempo real trata-se de uma técnica amplamente utilizada, que tem como objetivo detectar populações de microrganismos em tempo real, ciclo a ciclo, tendo como vantagem uma maior sensibilidade em relação ao PCR convencional (INAYATULLAH et al., 2022). Com isso, o objetivo deste trabalho é padronizar a técnica de PCR em tempo real e comparar as duas técnicas perante a definição de espécies de *Staphylococcus* coagulase positiva (SCP).

2. METODOLOGIA

Neste primeiro momento foram utilizadas como controle positivo para teste as cepas ATCC de *Staphylococcus aureus* 25923TM e 6538TM e um isolado de *S. epidermidis*, proveniente de linguças coloniais, caracterizada bioquimicamente, para controle negativo do teste. Cepas de outras espécies coagulase positiva estão sendo providenciadas para a padronização dos testes. A extração de DNA dos

controles foi feita segundo Sambrook e Russel (2001). Foram utilizados os mesmos primers nos dois tipos de reação, seguindo o trabalho de Sasaki et al. (2010), relacionados na tabela 1.

Tabela 1. Primers utilizados para a identificação de espécies de *Staphylococcus* coagulase-positivo

Primer	Sequência	Tamanho do produto	Espécie
Au-F3	TCGCTTGCTATGATTGTGG	359	<i>S. aureus</i>
Au-nucR	GCCAATGTTCTACCATAGC		
In-F	CATGTCATATTATTGCCAATGA	430	<i>S. intermedius</i>
In-R3	AGGACCATCACCATTGACATATTGAAACC		
Sch-F	AATGGCTACAATGATAATCACTAA	526	<i>S. schleiferi</i>
Sch-R	CATATCTGTCTTTTCGGCGCG		
Dea-F	TGAAGGCATATTGTAGAACAA	661	<i>S. delphini</i> grupo A
Dea-R	CGRTACTTTTCGTTAGGTCG		
Hy-F1	CATTATATGATTTGAACGTG	793	<i>S. hyicus</i>
Hy-R1	GAATCAATATCGTAAAGTTGC		
Pse-F2	TRGGCAGTAGGATTCGTAA	926	<i>S.</i>
Pse-R5	CTTTTGTGCTYCMTTTTGG		<i>pseudointermedius</i>
Deb-F	GGAAGRITTCGTTTTTCCTAGAC	1135	<i>S. delphini</i> grupo B
Deb-R4	TATGCGATTCAAGAACTGA		

Para a PCR convencional, foram utilizados 5 µL de tampão de reação 10×, 3 mM de dNTPS, 1.5 µL de MgCl₂, 10 µM de cada primer, e 0.5 µL de Taq DNA polimerase (LUDWIG BIOTECNOLOGIA Inc., RS, Brasil). Foi utilizado 50 ng de DNA da amostra, e o volume completado para 50 µL com água livre de DNase. A reação de termociclagem iniciou com a temperatura de 94 °C por 2 minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturação de 94 °C por 30 segundos, anelamento de 52 °C com 30 segundos e extensão de 72 °C por 30 segundos. Por último, um passo de 72 °C por 10 minutos e, posteriormente, mantido a 4 °C até a retirada do produto. O produto de PCR foi observado em gel de agarose 2% contendo marcador de peso molecular de 100 pb (LUDWIG BIOTECNOLOGIA Inc., Alvorada, RS, Brasil).

Já para a PCR em tempo real, foi utilizado 10 µL de GoTaq qPCR MasterMix (PROMEGA Inc.), 10 µM de cada primer, 50 ng de DNA e o volume total de 20 µL completado com água livre de DNase. As reações foram realizadas em placas de 96 poços, em termociclador Bio-Rad CFX Opus-96 (BIO-RAD In. CA, USA). A reação de termociclagem iniciou com um passo de ativação a 95 °C por 2 minutos, seguido de um passo desnaturação de 95 °C por 1 minuto e outro de anelamento a 56 °C por 35 segundos, repetidas por 40 ciclos. Por último, um passo de anelamento e outro de extensão a 56 °C por 35 segundos, seguidos por um passo de curva de fusão (*melt curve*), de 65 °C a 95 °C, com incrementos de 0,5 °C por 5 segundos. Os dados foram analisados utilizando o software Bio-Rad CFX Maestro (BIO-RAD In. CA, USA).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Até o momento, no presente trabalho foram realizadas PCR em tempo real e PCR convencional para os controles positivos e negativos descritos na metodologia, onde pôde-se observar a amplificação dos controles positivos em ambas e o controle negativo permaneceu inalterado. A otimização do ensaio de PCR em tempo real incluirá a determinação da temperatura de anelamento ideal por meio de gradiente térmico. A especificidade de cada reação será confirmada pela análise da curva de dissociação.

Atualmente a PCR em tempo real é mais empregada para identificação de espécies em comparação a convencional (INAYATULLAH et al., 2022), apresentando vantagens, como por exemplo, o registro contínuo das reações, a curva de *melting* além de não depender da eletroforese em gel de agarose para determinar os amplicons (DORLASS et al., 2020). Pontos positivos da PCR em tempo real já foram estudados e publicadas por diversos pesquisadores (ZHANG et al. 2020). A PCR em tempo real apresenta alta precisão e exatidão durante a detecção em cada ciclo (fase exponencial), o que não é possível de ser realizado com a PCR convencional, que determina o resultado na fase final da amplificação (fase de platô), apresentando precisão ser menor que a PCR em tempo real (KARIMI et al. 2020).

Portanto, mesmo que a PCR convencional continue sendo utilizada, a PCR em tempo real demonstra mais facilidade na sua execução, além de alta sensibilidade, rapidez e a capacidade de quantificação. Essas vantagens tornam a técnica essencial para diagnósticos mais precisos e eficazes, especialmente na medicina veterinária (LABMOL VET, 2025).

4. CONCLUSÕES

Os resultados preliminares deste trabalho sugerem a funcionalidade e a especificidade dos primers para *S. aureus* nas plataformas de PCR convencional e PCR em tempo real. Estes achados validam a abordagem inicial e fornecem a base para as próximas etapas do projeto envolvendo a padronização e validação do ensaio multiplex para a identificação simultânea das demais espécies de SCP.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

MCMILLAN K., et al. 2016. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates from raw milk sources in Victoria, Australia. BMC Microbiol:1–12.

ZHANG, J. et al. Prevalence, antibiotic resistance, and enterotoxin genes of *Staphylococcus aureus* isolated from milk and dairy products worldwide: A systematic review and meta-analysis. Food Research International. 162: 2022.

BEZERRA, J. S. et al. Effect of high somatic cell counts on the sensory acceptance and consumption intent of pasteurized milk and coalho cheese. Food Science Technology. 1- 9, 2020.

THAMMASITTIRONG, S. et al. Molecular characterization of lepidopteran-specific toxin genes in *Bacillus thuringiensis* strains from Thailand. **3 Biotech**, v. 9, n. 4, p. 117, 2019.

LIU, X. et al. Analytical comparisons of sARS-COV-2 detection by qRT-PCR and ddPCR with multiple primer/ probe sets. *Emerging Microbes & Infections*, 9 (1), 1175 – 1179. DOI: 10.1080/22221751.2020.1772679. 2020.

INAYATULLAH, A. et al. Comparison of Real-Time PCR and Conventional PCR by Identifying Genomic DNA of Bovine and Porcine. 2022.

JOHNSON, R.L. et al. Evaluation of the GENE-UP Salmonella Method for the Detection of Salmonella Species in a Broad Range of Foods and Select Environmental Surfaces: Collaborative Study, First Action 2020.02. *J AOAC INT*, v. 104, p.1084-1097, 2021. DOI: 10.1093/jaoacint/qsab005.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3ª ed. Nova York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SASAKI T. et al. Multiplex-PCR Method for Species Identification of Coagulase-Positive Staphylococci. *J Clin microbiology*. <https://doi.org/10.1128/jcm.01232-09>. 2010.

DORLASS, E et al. Lower cost alternatives for molecular diagnosis of Covid – 19: conventional RT – PCR and SYBR green – based RT – qPCR. *Brazilian Journal of Microbiology*, 51, 1117–1123. doi. org/10.1007/s42770-020-00347-5. 2020.

KARAMI A. et al. Conventional PCR assisted single – component assembly of spherical nucleic acids for simple colorimetric detection of SARS – CoV – 2. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 328, 128971. doi.org/10.1016/j.snb.2020.128971. 2020.

ZHANG, S. et al. Phylogenetic relationships among Scirtothrips species and related genera (Thysanoptera, Thripidae) based on morphology. *Zoologischer Anzeiger*, 280, 1–13. doi.org/10.1016/j.jcz.2019.02.004. 2019.

KARIMI, K. et al. Development of novel species – specific primers for the specific identification of *Colletrichum nymphaeae* based on conventional PCR and LAMP techniques. *European Journal of Plant Pathology*, 156, 463 – 475. doi.org/10.1007/s10658-019-01895-9. 2020.

LABMOL VET. Real Time PCR vs PCR Convencional: Qual é a diferença? [online] Disponível em: <https://labmolvet.com.br/2025/01/real-time-pcr-vs-pcr-convencional-qual-e-a-diferenca/>. 2025.