

# Desenvolvimento e validação de PCR em tempo real para detecção de DNA mitocondrial bovino em amostras de alimentos para consumo animal

Cleiton Schneider Pereira<sup>1</sup>, Nilo Ikuta<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Acadêmico de Medicina Veterinária – ULBRA <sup>2</sup>Docente - ULBRA

## INTRODUÇÃO

Material de origem animal possui um alto valor biológico devido à elevada qualidade nutricional, com proporções ideais de todos os aminoácidos para atender às necessidades orgânicas das mais diversas espécies animais. Dessa forma, subprodutos do abate (como ossos, sangue e vísceras) são bastante utilizados para o enriquecimento proteico de alimentos processados, suplementos e rações, favorecendo o ganho de massa muscular nos animais. No entanto, o uso deste tipo de matéria-prima tem sido indesejado na alimentação bovina, principalmente pelo risco de aparecimento da encefalopatia espongiforme, conhecida popularmente como doença da vaca louca. Técnicas de biologia molecular permitem uma avaliação precisa do material genético (DNA) neste tipo de situação, permitindo a detecção da presença de matérias-primas de qualquer espécie animal nos mais diversos tipos de alimentos.

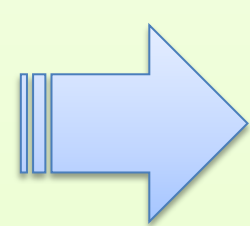
## OBJETIVOS

O objetivo deste estudo foi desenvolver e validar um teste de reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real para detecção específica de DNA mitocondrial bovino, possibilitando assim a análise da presença de material de origem bovina em alimentos para consumo humano e animal.

## METODOLOGIA



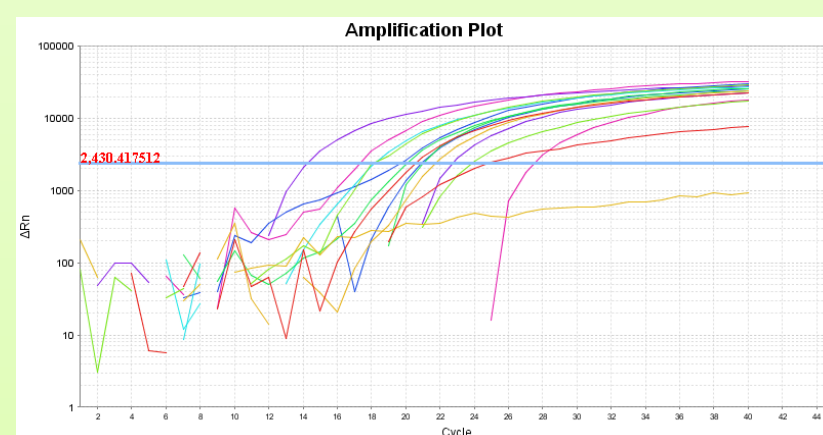
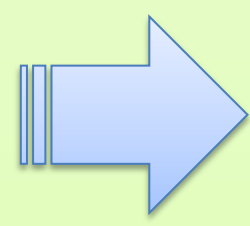
Obtenção das amostras



Extração das amostras (Método de Sílica)



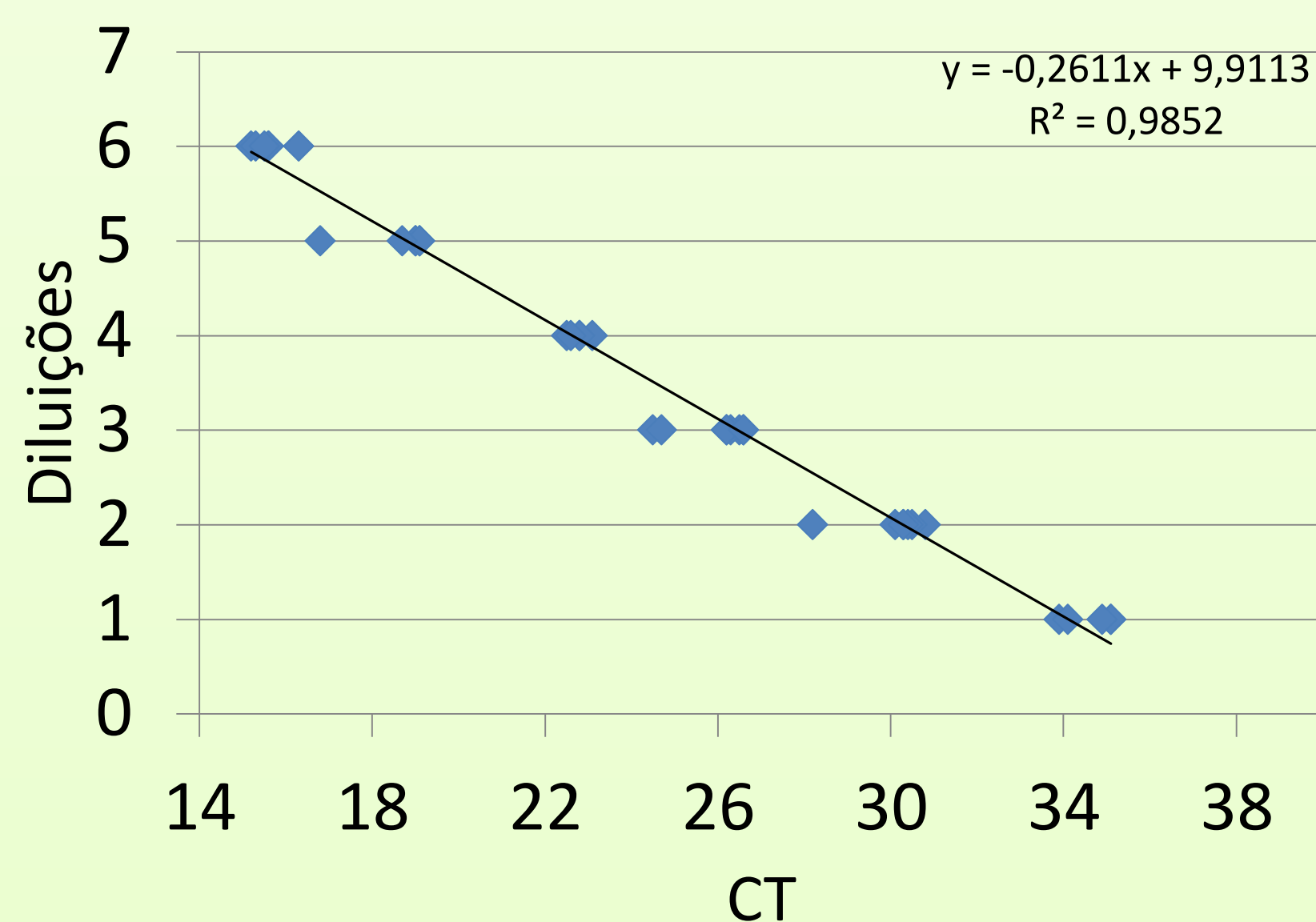
Amplificação (PCR em tempo real)



Avaliação (Gráfico de Cycle Threshold)

## RESULTADOS

O teste desenvolvido utilizando *primers* e sonda específicos para o gene do citocromo *b* bovino foi capaz de amplificar e detectar DNA extraído a partir de amostras bovinas. Os resultados demonstraram uma ampla faixa de linearidade do teste (cinco diluições decimais) e uma provável alta sensibilidade analítica (Figura 1).



**Figura 1.** Diluições seriadas (3 replicatas) de DNA extraído de amostra de fígado bovino e respectivos CTs

Eixo Y representa as diluições seriadas (1=10<sup>-5</sup>, 2=10<sup>-4</sup>, 3=10<sup>-3</sup>, 4=10<sup>-2</sup>, 5=10<sup>-1</sup> e 6=10<sup>0</sup>). Eixo X representa o número de ciclos necessários para leitura (CT, *cycle treshold*).

Posteriormente, amostras clínicas de pelo e sangue de diferentes animais (n=16) foram submetidas ao processo completo de análise e todas apresentaram resultados positivos com CTs médios de 20,8 (amostras de pelo) e 21,4 (amostras de sangue). Amostras de rações para diferentes espécies animais também foram avaliadas para a presença de DNA bovino (Tabela 1). Entre as rações analisadas, apenas as amostras 7 e 8 tinham no rótulo da embalagem a identificação da presença de material de origem bovina na composição do produto.

**Tabela 1.** Presença de material de origem bovina nas rações avaliadas

Amostras	Espécie	Resultado (CT)
Ração 1	Bovinos	Negativo
Ração 2	Aves	Negativo
Ração 3	Aves	Negativo
Ração 4	Felinos	Negativo
Ração 5	Felinos	Negativo
Ração 6	Felinos	Negativo
Ração 7	Caninos	Positivo (25,4)
Ração 8	Caninos	Positivo (24,9)
Ração 9	Caninos	Positivo (30,6)

## CONCLUSÕES

O teste de PCR em tempo real possibilitou a detecção de DNA bovino, apresentando ampla faixa linear e elevada sensibilidade analítica. Adicionalmente o teste detectou a presença de DNA bovino em amostras de rações. Novos estudos estão sendo realizados para realizara a análise quantitativa de DNA bovino em alimentos humanos e rações.

## BIBLIOGRAFIA

- KRCMAR, P., RENCOVA, E. Quantitative Detection of Species-Specific DNA in Feedstuffs and Fish Meals. *J Food Prot*, v.68, n.6, p.1217–1221, 2005.  
KRCMAR, P., RENCOVA, E. Identification of Bovine-Specific DNA in Feedstuffs. *J Food Prot*, v.64, n.1, p.117-119. 2001