

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS  
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia  
Agroindustrial



Dissertação

**Multiplex PCR para identificação de *S. aureus*, *S. intermedius* e *S. hyicus***

**Caroline Peixoto Bastos**

Pelotas, 2008

**CAROLINE PEIXOTO BASTOS**

**Multiplex PCR para identificação de *S. aureus*, *S. intermedius* e *S. hyicus***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área do conhecimento: Microbiologia de Alimentos).

Orientador: Wladimir Padilha da Silva

Pelotas  
Rio Grande do Sul – Brasil  
2008

**Dados de catalogação na fonte:**  
( Marlene Cravo Castillo – CRB-10/744 )

B327m Bastos, Caroline Peixoto  
Multiplex PCR para identificação de S. aureus , S.  
intermedius e S. hyicus / Caroline Peixoto Bastos. -Pelotas,  
2009.  
55f. : il.

Dissertação ( Mestrado ) –Programa de Pós-Graduação  
em Ciência e Tecnologia Agroindustrial. Faculdade de  
Agronomia Eliseu Maciel. Universidade Federal de Pelotas.  
- Pelotas, 2009, Wladimir Padilha da Silva, Orientador.

1. Estafilococos coagulase positiva 2. Controle interno  
3. Amplificação 4. PCR I Silva, Wladimir Padilha da  
(orientador) II .Título.

CDD 576.19

**Banca examinadora:**

Prof. Dr. Wladimir Padilha da Silva (UFPel)

Profa. Dra. Ângela Nunes Moreira (UFPel)

Profa. Dra. Marisa Ribeiro de Itapema Cardoso (UFRGS)

Agradeço...

A Deus que sempre me iluminou.

A Universidade Federal de Pelotas, em especial ao Programa de Pós-Graduação em  
Ciência e Tecnologia Agroindustrial, que permitiu a realização deste trabalho e a  
Capes pela concessão da bolsa de estudo.

Ao Professor e amigo Wladimir Padilha da Silva, pela valiosa orientação, confiança e  
ensinamentos.

Aos amigos do Centro de Biotecnologia, Ângela, Fabrício e Gustavo.

Aos meus amigos do Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Elen, Karla,  
Marcelo Mendonça, Andréia, Kátia, Celso, Milena, Márcia Araújo, Rodrigo, Júlia,  
Laurí, em especial ao Fernando Zocche pela amizade e apoio para que este trabalho  
se realizasse.

Aos meus amados pais Airton e Lúcia que sempre me incentivaram e me mostraram  
a importância do estudo.

Aos meus irmão Juliano e Matheus pelo amor e carinho.

Ao Ricardo, meu amor, por estar sempre junto a mim.

A minha filha Ana Luiza, meu maior amor.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram de alguma forma para a  
realização deste trabalho.

Meu muito abrigada!

## RESUMO

BASTOS, Caroline Peixoto. **Multiplex PCR para identificação de *S. aureus*, *S. intermedius* e *S. hyicus***. 2008. 53f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus hyicus* e *Staphylococcus intermedius* são espécies do gênero *Staphylococcus* com capacidade de produzir enterotoxinas, bem como as enzimas termonuclease e coagulase, sendo denominadas de Estafilococos Coagulase Positiva (ECP). Apresentam características morfológicas e bioquímicas extremamente semelhantes, o que torna difícil sua diferenciação assim como sua identificação em alimentos através de técnicas fenotípicas de análise microbiológica. Dessa forma, este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de um Multiplex PCR (mPCR), tendo-se como alvo o gene *nuc* (codifica para a termonuclease), para a identificação de *S. aureus*, *S. intermedius* e *S. hyicus*. Inicialmente, o mPCR foi padronizado utilizando-se cepas padrão de *S. aureus*, *S. warneri*, *S. lugdunensis* e *Listeria monocytogenes* e isolados de *S. hyicus* e *S. intermedius*, e, posteriormente, foi testado em 16 isolados das três espécies de ECP. Foram avaliadas a sensibilidade dos *primers* para cada uma das três espécies, as condições da mPCR, a sensibilidade do Controle Interno de Amplificação (IAC) para o gênero Estafilococos, e as seqüências obtidas através da amplificação por PCR. Posteriormente, os resultados foram comparados aos obtidos com testes bioquímicos de diferenciação de ECP. Foram utilizados os *primers* NUC1-NUC2 (para seqüências do gene *nuc* de *S. aureus*), NUC5-NUC6 (para seqüências do gene *nuc* de *S. intermedius*), NUC7-NUC8 (para seqüências do gene *nuc* de *S. hyicus*) e, para amplificação do IAC, os *primers* 16S1 – 16S2 (para seqüências do gene 16S do rRNA). O mPCR proposto possibilitou a identificação das espécies *S. aureus*, *S. hyicus* e *S. intermedius*, bem como o IAC utilizado apresentou sensibilidade para o gênero. As seqüências obtidas na PCR apresentaram elevado

grau de similaridade com as seqüências do gene da termonuclease depositadas no GenBank. A mPCR apresentou maior poder discriminatório que os testes bioquímicos para identificação de *S. aureus*, *S. hyicus* e *S. intermedius*, bem como reduziu significativamente o tempo necessário para a identificação de ECP (redução de 24h) ou de identificação em nível de espécie (redução de 72h).

Palavras-chave: Estafilococos coagulase positiva. Controle Interno de Amplificação. mPCR.

## ABSTRACT

BASTOS, Caroline Peixoto. **Multiplex PCR para identificação de *S. aureus*, *S. intermedius* e *S. hyicus***. 2008. 55f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus hyicus* e *Staphylococcus intermedius* are species of genus *Staphylococcus* capable of producing enterotoxins, as well as the enzymes thermonuclease and coagulase, and are called *Staphylococcus* Coagulase Positive (SCP). They show very similar biochemical and morphological characteristics, this fact, makes their differentiation and they identification in food by phenotypic techniques very difficult. In this way, the aim of this work was the development of a Multiplex PCR (mPCR), targetting the *nuc* gene (encoding for thermonuclease) as target, for the identification of *S. aureus*, *S. intermedius*, and *S. hyicus*. Initially, the mPCR was standartized using reference strains of *S. aureus*, *S. warneri*, *S. lugdunensis* and *Listeria monocytogenes* and isolates of *S. hyicus* and *S. intermedius*, after words it was tested with 16 isolates of the three species of SCP. The primers annealing to each of the three species, the conditions for mPCR, the suitability of the Internal Amplification Control (IAC) for the genus *Staphylococcus*, and the sequences obtained through the amplification by PCR were evaluated. After this, the results were compared with those achieved by biochemical tests for differentiation of SCP. Primers NUC1-NUC2 (for sequences of the *S. aureus nuc* gene), NUC5-NUC6 (for sequences of the *S. intermedius nuc* gene), NUC7-NUC8 (for sequences of the *S. hyicus nuc* gene) and, as IAC, the primers 16S1 – 16S2 (for sequences of the 16S of rRNA gene) were used. The mPCR proposed enable the identification of *S. aureus*, *S. hyicus* e *S. intermedius*, and the IAC was suitable for the genus. The sequences obtained in PCR showed a high degree of similarity with the sequences of the thermonuclease gene deposited in GenBank. The mPCR showed greater discriminatory power that the biochemical tests for identification the



*S. aureus*, *S. hyicus* e *S. intermedius*, as well as reduced the time required for the identification of ECP (reduction of 24h) or identification of specie (reduction of 72h).

Key-words: Staphylococcus coagulase positive, internal amplification control, mPCR.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Produtos da uniplex PCR obtidos com os primers NUC1 e NUC2 e DNAs de *S. aureus*, visualizados em gel de agarose (1%). Pista 1 – 3: *S. aureus* FRI 326, FRI 361e FRI 472; pista 4 e 5: *S. aureus* de origem clínica; pista 6 – marcador de peso molecular Ladder 100pb Biolabs®.....34
- Figura 2 – Produtos da uniplex PCR obtidos com os primers NUC5 e NUC6 e DNAs de *S. intermedius*, visualizados em gel de agarose (1%). Pista 1 – marcador de peso molecular Ladder 100pb Biolabs®; pista 2 – 6: *S. intermedius* de origem clínica.....35
- Figura 3 – Produtos da uniplex PCR obtidos com os primers NUC7 e NUC8 e DNAs de *S. hyicus*, visualizados em gel de agarose (1%). Pista 1 – marcador de peso molecular Ladder 100pb Biolabs®; pista 2 – 6: *S. hyicus* de origem clínica.....36
- Figura 4 – Produtos obtidos com os primers 16S1 e 16S2 e DNAs de estafilococos, visualizados em gel de agarose (1%). Pista 1 e 7 – marcador de peso molecular Ladder 100pb Biolabs®; pista 2: *S. aureus*; pista 3: *S. intermedius*; pista 4: *S. hyicus*; pista 5: *S. warnery*; pista 6: *S. lugdunensis*.....37
- Figura 5 – Produtos da mPCR obtidos com os primers NUC 1, 2, 5, 6, 7, 8 e 16S1 e 16S2, visualizados em gel de agarose (1%). Pista 1 – Produto de mPCR obtidos com *Listeria monocytogenes*; pista 2 e 3 – Produtos de mPCR obtidos com isolados clínicos de *S. hyicus*; pista 4 e 5 – Produtos de mPCR obtidos com isolados de *S. intermedius*; pista 6 e 7 – Produtos de mPCR obtidos com *S. aureus* FRI 326; pista 8 – Produto de mPCR obtidos com *S. warneri*; pista 9 – Produto de mPCR obtidos com *S. lugdunensis*; pista 10 - marcador de peso molecular Ladder 100pb Biolabs®.....38
- Figura 6 – Produtos da mPCR obtidos com os primers NUC 1, 2, 5, 6, 7, 8 e 16S1 e 16S2 e DNAs de estafilococos, visualizados em gel de agarose (1%). Pista 1 – marcador de peso molecular Ladder 100pb Biolabs®; pista 2 – *S. aureus* FRI 326; pista 3 – *S. hyicus* de origem clínica; pista 4 – *S. intermedius* de origem clínica; pista 5 – *S. warneri*; pista 6 – *S. lugdunensis*.....39

- Figura 7 – Produto da mPCR obtidos com os primers NUC 1, 2, 5, 6, 7, 8 e 16S1 e 16S2 e DNAs dos três ECP na mesma reação, visualizados em gel de agarose (1%). Pista 1 – marcador de peso molecular Ladder 100pb Biolabs®; pista 2 – *S. aureus* FRI 326, *S. hyicus* de origem clínica, *S. intermedius* de origem clínica.....40
- Figura 8 – Produto da mPCR obtidos com os primers NUC 1, 2, 5, 6, 7, 8 e 16S1 e 16S2 e DNAs de estafilococos, visualizados em gel de agarose (1%). Pista 1, 8 e 15 – marcador de peso molecular Ladder 100pb Biolabs®; pista 2 a 7, 9 a 14 – isolados de *S. aureus* (458pb), *S. hyicus* (740pb) e *S. intermedius* (106pb).....42
- Figura 9 – Produto da mPCR obtidos com os primers NUC 1, 2, 5, 6, 7, 8 e 16S1 e 16S2 e DNAs de estafilococos, visualizados em gel de agarose (1%). Pista 1 – marcador de peso molecular Ladder 100pb Biolabs®; pista 2 a 5 – isolados de *S. aureus*.....42

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 – Oligonucleotídeos utilizados para identificação, diferenciação molecular e controle interno de *S. aureus*, *S. intermedius* e *S. hyicus*, seqüência de bases, produtos de PCR estimados e espécies alvos .....30
- Tabela 2 – Comparação entre testes bioquímicos e mPCR para identificação de *S. aureus*, *S. hyicus* e *S. intermedius*.....44

## SUMÁRIO

|  | Página |
|--|--------|
| 1. Introdução.....   | 13     |
| 2. Revisão bibliográfica.....  | 15     |
| 2.1 <i>Staphylococcus spp.</i> .....   | 15     |
| 2.1.1 Histórico.....   | 15     |
| 2.1.2 O gênero <i>Staphylococcus</i> .....   | 15     |
| 2.2 Estafilococos coagulase positiva (ECP).....  | 17     |
| 2.3 Termonuclease.....   | 19     |
| 2.4 Técnicas bioquímicas e moleculares para identificação e diferenciação entre os estafilococos coagulase positiva..... | 19     |
| 2.4.1 Multiplex PCR .....  | 21     |
| 2.4.2 Controle Interno de Amplificação (IAC).....  | 22     |
| 3. Materiais e métodos.....  | 23     |
| 3.1 Microrganismos.....  | 23     |
| 3.2 Identificação bioquímica de <u>Estafilococos</u> Coagulase Positiva.....   | 23     |
| 3.2.1 Meios de cultura, soluções, reagentes e outros.....  | 23     |
| 3.2.2 Testes bioquímicos para identificação de <u>Estafilococos</u> <u>Coagulase</u> <u>Positiva</u> ...24               | 24     |
| 3.2.2.1 Coloração diferencial de Gram e produção de catalase.....  | 24     |
| 3.2.2.2 Produção de coagulase livre.....   | 24     |
| 3.2.2.3 Resistência a acriflavina.....   | 25     |
| 3.2.2.4 Produção de β-galactosidase.....   | 25     |
| 3.3 Extração do DNA e identificação molecular de cepas de <u>Estafilococos</u> <u>Coagulase</u> <u>Positiva</u> .....    | 26     |
| 3.3.1 Meios de cultura, soluções, reagentes e outros.....  | 26     |
| 3.3.2 Equipamentos.....  | 27     |
| 3.3.3 Extração de DNA.....   | 27     |

|   |    |
|---|----|
| 3.3.4 Estimativa do DNA obtido.....   | 28 |
| 3.3.5 Amplificação de seqüências dos genes <i>nuc</i> e <i>rRNA</i> .....   | 29 |
| 3.3.5.1 <i>Primers</i> .....  | 29 |
| 3.3.6 Reação uniplex-PCR.....   | 30 |
| 3.3.7 Multiplex PCR.....  | 31 |
| 3.3.8 Visualização e análise dos produtos amplificados.....   | 31 |
| 3.3.9 Seqüenciamento.....   | 31 |
| 4. Resultados e discussão.....  | 32 |
| 4.1 <u>Identificação e diferenciação bioquímica entre as espécies</u> de estafilococos<br><u>coagulase positiva</u> ..... | 32 |
| 4.2 <u>Identificação e diferenciação molecular entre as espécies</u> de estafilococos<br><u>coagulase positiva</u> .....  | 33 |
| 4.2.1 Especificidade dos <i>primers</i> .....   | 33 |
| 4.2.2 Padronização do Multiplex PCR (mPCR).....   | 37 |
| 4.2.3 Análise das seqüências dos produtos de PCR.....   | 41 |
| 4.2.4 Utilização do mPCR em isolados de ECP.....  | 41 |
| 4.3 Comparação entre os testes bioquímicos e mPCR para identificação de ECP...43  |    |
| 5. Conclusões.....  | 45 |
| 6. Referências.....   | 46 |

## 1 INTRODUÇÃO

*Staphylococcus aureus* é uma bactéria de ocorrência freqüente em todo o mundo, e muitos surtos e casos de intoxicação alimentar estafilocócica já foram atribuídos a esta espécie (IKEDA et al., 2005; JØRGENSEN et al., 2005; HWANG et al., 2007). Porém, outras espécies pertencentes ao gênero *Staphylococcus* também apresentam capacidade enterotoxigênica, em especial *S. hyicus* e *S. intermedius* (VALLE et al., 1990; HOOVER et al., 1993; JAY, 2005).

Estas três espécies microbianas apresentam características morfológicas, bem como reações bioquímicas, extremamente semelhantes, o que torna difícil sua diferenciação (BANDEIRA, 2001; GANDRA 2003). Na rotina laboratorial, tanto em análises de alimentos quanto em análises clínicas, o teste de coagulase em tubo (coagulase livre) é o método padrão empregado para identificar e classificar *Staphylococcus* como coagulase positiva e, muitas vezes, o único teste utilizado para identificar um isolado como sendo *S. aureus* (DOWNES & ITO, 2001; SILVA et al., 2001). Entretanto, este procedimento não permite diferenciar *S. aureus* de *S. intermedius* nem de *S. hyicus*, evidenciando a necessidade de métodos mais eficazes para a detecção desses microrganismos em alimentos (BANDEIRA, 2001; GANDRA 2003).

Métodos moleculares para diagnóstico de bactérias patogênicas em alimentos estão sendo utilizados como ferramentas mais rápidas e eficazes de diferenciação e identificação de microrganismos (FARBER et al., 2001; KONEMAN et al., 2001; MALORNY et al., 2002). O desenvolvimento da técnica de amplificação pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) permitiu a utilização de seqüências específicas do genoma microbiano como marcadores genéticos em nível de gênero, de espécie, bem como de subespécie, podendo ser utilizado como uma alternativa viável aos métodos morfológicos e bioquímicos tradicionalmente utilizados (FARBER et al., 2001). Salienta-se que o maior problema de grande parte dos trabalhos publicados em que se utilizou PCR, é a não inclusão de um controle interno de amplificação

(IAC), o qual é utilizado para avaliar a ocorrência de resultados falso negativos (HOORFAR et al., 2004; KLERKS et al., 2004).

Várias modificações da PCR foram descritas, dentre essas, destaca-se a Multiplex PCR (mPCR). Nesta técnica utiliza-se mais de um par de *primers* na mesma reação, possibilitando a amplificação simultânea de seqüências de DNA, portanto, mais de uma espécie bacteriana pode ser identificada na mesma reação, promovendo uma análise mais ampla e mais rápida, quando comparada aos testes tradicionais de diagnóstico, e de menor custo quando comparada a outras técnicas moleculares (GANDRA, 2006).

A partir do exposto, desenvolveu-se este estudo, a fim de contemplar os seguintes objetivos:

- I. Padronizar um Multiplex PCR (mPCR) com *primers* baseados no gene *nuc*, para diferenciar três espécies de estafilococos coagulase positiva: *S. aureus*, *S. hyicus* e *S. intermedius*;
- II. Otimizar as condições de utilização de um IAC na mPCR;
- III. Comparar o mPCR com testes bioquímicos (resistência a acriflavina e capacidade de produção de  $\beta$ -galactosidade) na identificação de Estafilococos Coagulase Positiva.



## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 *Staphylococcus spp.*

#### 2.1.1 Histórico

A primeira descrição de bactérias do gênero *Staphylococcus* foi realizada por **OGOSTON** em 1880 (apud LEVY, 1997). As primeiras espécies foram discriminadas através da produção de pigmentos: *S. aureus*, com colônias de cor amarelo dourado e *S. albus* com colônias brancas. Em 1974, BAIRD PARKER descreveu que apenas três espécies tinham importância clínica, utilizando como característica diferencial a prova da coagulase: a) coagulase-positiva - *S. aureus*; b) coagulase-negativa - *S. epidermidis* e *S. saprophyticus* (BAIRD PARKER, 1974).

#### 2.1.2. O gênero *Staphylococcus*

*Staphylococcus spp.* juntamente com *Planococcus*, *Micrococcus*, *Stomatococcus* pertencem à família *Micrococcaceae*, são cocos Gram-positivos, com tamanho que varia entre 0,5 e 1,5 $\mu$ m, imóveis e não formadores de esporos. Dividem-se seguindo um padrão que resulta em arranjo semelhante a um cacho de uvas. Entretanto, dependendo da idade da colônia, podem ser encontradas isoladas, aos pares, agrupadas em tétrades ou, ainda, em pequenas cadeias. A maior parte das espécies apresenta metabolismo fermentativo e respiratório, neste último vindo a produzir catalase, e têm capacidade de fermentar uma grande variedade de carboidratos, principalmente em condições de aerobiose, com produção final de ácido, mas não de gás (SNEATH et al., 1986; KLOOS & BANNERMAN, 1999;

FRANCO & LANDGRAF, 2002). Multiplicam-se em uma faixa de pH compreendida entre 4,0 e 9,8, com ótimo entre 6 e 7, apresentam temperatura de crescimento entre 7 a 47,8°C, tolerância a concentrações de 10 a 20% de NaCl e a nitratos, e capacidade de crescer em valores de atividade de água (Aa) de 0,86, apesar de, sob condições ideais, poderem desenvolver-se em valores de Aa de até 0,83, sem, no entanto, produzir enterotoxinas (FRANCO & LANDGRAF, 2002; JAY, 2005).

*Staphylococcus* spp. são microrganismos de ampla distribuição, mas são encontrados principalmente na pele e nas mucosas dos seres humanos e de outros mamíferos e aves (NEVES et al., 2007). As vias de transmissão podem ser pessoa-pessoa, objetos-pessoa (ou vice-versa), animais-pessoas (ou vice-versa). Pode ocorrer, inclusive, de pessoas infectadas, mas que não apresentam sintomas, para outras saudáveis.

Na atualidade, o gênero *Staphylococcus* é composto por 41 espécies e 24 subespécies (EUZEBY, 2008), sendo que *S. aureus* é a espécie mais estudada e envolvida em [intoxicação alimentar e em diversas](#) infecções.

*Staphylococcus* spp. podem ser tanto comensais como patógenos extremamente [versáteis](#) em humanos, causando três síndromes básicas: (i) lesões superficiais como abscessos da pele e infecções localizadas; (ii) infecções sistêmicas como a osteomielite, endocardite, pneumonia, bacteremia e septicemia; (iii) síndromes tóxicas como a síndrome do choque tóxico (TSS), síndrome da pele escaldada e intoxicação alimentar (ARBUTHNOTT et al., 1990; LINA et al., 1999). [Entre](#) as doenças causadas por toxinas, as intoxicações alimentares estafilocócicas merecem destaque por [serem](#) as que mais acometem a população, [sendo](#) causadas pela ingestão de enterotoxinas produzidas e liberadas durante a multiplicação dos estafilococos coagulase positiva (ECP) nos alimentos. Essas enterotoxinas estafilocócicas (EE) são proteínas extracelulares de baixo peso molecular, [podendo variar de](#) 26.000 a 29.600 daltons (NORMANNO et al., 2005), pertencem a uma grande família de exotoxinas pirogênicas, são resistentes à hidrólise pelas enzimas gástricas e jejunais (FREIRAS et al., 2004) e termoestáveis. [Essa última característica](#) é observada pela viabilidade após aquecimento à 100°C durante 30 minutos (MURRAY et al., 1999) e [após](#) temperaturas de [pasteurização](#) lenta e rápida (FRANCO & LANDGRAF, 2002). Isto pressupõe que as atividades biológicas das [EE](#) permanecem inalteradas, mesmo após o tratamento térmico usual dos alimentos,

possibilitando quadros de intoxicação alimentar no homem (HOLECKOVÁ et al., 2002). O aparecimento dos sintomas de intoxicação alimentar estafilocócica depende da quantidade, tipo e toxicidade das toxinas (BHATIA & ZAHOOOR, 2007), porém, geralmente ocorrem após 4 horas da ingestão do alimento contaminado. Os principais sintomas são náuseas, vômitos, cólicas abdominais, podendo também ocorrer diarreia, sudorese e diminuição da temperatura corporal, sendo, geralmente, auto-limitantes, durando de 24 a 48 horas (FRANCO & LANDGRAF, 2002; JAY, 2005).

A notificação da intoxicação estafilocócica não é considerada compulsória no Brasil e em diversos países, portanto, a verdadeira incidência é desconhecida, devido à sintomatologia branda e de curta duração, uma vez que apenas grandes surtos chegam ao conhecimento das autoridades sanitárias (STAMFORD et al., 2006).

## 2.2 Estafilococos coagulase positiva (ECP)

Entre as 41 espécies de estafilococos, cinco são capazes de produzir coagulase livre: *S. aureus*, *S. hyicus* (DEVRIESE et al., 1978), *S. intermedius* (HÁJEK, 1976), *S. schleiferi* subsp. *coagulans* (FRENEY et al., 1988) e *S. delphini* (VARALDO et al., 1988) e, destas, apenas *S. aureus*, *S. hyicus* e *S. intermedius* já foram associadas a surtos de intoxicação alimentar. Com relação às outras duas espécies coagulase positiva, não há relato de seu isolamento em alimentos nem de seu envolvimento em casos de intoxicação alimentar (KLOOS & BANNERMAN, 1999; KONEMAN et al., 2001).

*Staphylococcus aureus* é um dos mais importantes patógenos bacterianos que causam infecções clínicas e que estão envolvidos em casos de intoxicação alimentar (CHIANG et al., 2008) e, segundo TIRADO & SCHIMDT (2001 apud MORANDI, 2007), é considerado, no mundo, o terceiro maior responsável por doenças alimentares causadas por microrganismos. Diversos surtos de intoxicação alimentar já foram atribuídos a este agente patogênico (IKEDA et al., 2005; JØRGENSEN et al., 2005). As peculiaridades do seu habitat tornam sua presença amplamente distribuída na natureza, sendo transmissíveis aos alimentos pelos

animais, principalmente o gado leiteiro com mastite, e por manipuladores, na maioria, portadores assintomáticos (BALABAN & RASOOLY, 2000). Portanto a presença desse microrganismo em alimentos processados é interpretada como indicativa de contaminação dos manipuladores, bem como de limpeza e sanificação inadequada de superfícies e de utensílios, materiais e equipamentos (ICMSF, 1985; SIQUEIRA, 1995). NOVAK (1999) relata que *S. aureus* enterotoxigênicos podem ser carregados para os alimentos durante ou após o processamento através do manuseio inadequado, e que a refrigeração deficiente possibilita o crescimento do microrganismo e a produção e liberação de enterotoxinas no alimento.

Em 1976, *Staphylococcus intermedius* foi descrito por HAJEK (1976 apud COELHO et al., 2007; SASAKI et al., 2007) como sendo uma nova espécie, a qual foi isolada da via aérea de pombos, cães e cavalos, sendo encontrada em um amplo espectro de espécies animais, podendo causar infecções cutâneas, urinárias, ósseas e do sistema nervoso central (CHAFFER et al., 1999; AARESTRUP et al., 1995; KONEMAN et al., 2001; JAY, 2005). Essa bactéria foi isolada de feridas infectadas em seres humanos, causadas por mordeduras de cães, sendo também isolada em casos de mastite bovina (BANDEIRA, 2001; KONEMAN et al., 2001), Assim como *S. aureus*, *S. intermedius* apresenta a capacidade de produzir enterotoxinas (JAY, 2005) e foi relacionado a um surto de intoxicação alimentar (KHAMBATI et al. 1994).

*Staphylococcus hyicus*, assim como *S. intermedius*, é considerado um patógeno de interesse veterinário (OLIVEIRA, 2000) encontrado, principalmente, em suínos e bovinos, tendo sido isolado, inclusive, no leite dessa última espécie (BANDEIRA, 2001). É, freqüentemente, associado a epiderme exudativa, uma doença aguda que acomete suínos lactentes e recém desmamados (DEVRIESE et al., 1978; KONEMAN et al., 2001). Segundo WATTS & OWENS (1989) e BANDEIRA (2001), *S. hyicus*, juntamente com *S. aureus* é, muitas vezes, a bactéria predominantemente encontrada em rebanhos leiteiros com problemas de mastite. JAY (2005) ressalta a capacidade enterotoxigênica dessa espécie de estafilococos, fato comprovado por VALLE et al. (1990), que verificaram em cepas de *S. hyicus* coagulase positiva isoladas em ovinos, a produção de EEC. Da mesma forma, ADESIYUN et al. (1984) e HOOVER et al. (1993) isolaram cepas de *S. hyicus* que produziam EEA, EEB, EEC, EED e EEE.

### 2.3 Termonuclease

As três espécies coagulase positiva são comprovadamente produtoras de termonuclease e, por sua vez, portadoras desse gene, o qual tem sido utilizado em diversos trabalhos, como controle de amplificação em PCR (BARKSI et al., 1996), para identificação destas espécies (SILVA et al., 2003; BECKER et al., 2005) e para diferenciação entre espécies de estafilococos (KLOOS & BANNERMAN, 1999; KONEMAN et al., 2001; JAY, 2005). A enzima termonuclease ou endonuclease termoestável (TNase), produzida como fator de virulência, é uma proteína de massa molecular de 17.000 Daltons, capaz de degradar o DNA e o RNA em fosfomonucleosídeos (OLIVEIRA et al., 1999). A TNase pode manter sua atividade enzimática mesmo a 100°C por um período de até uma hora (BRAKSTAD, et al., 1992). Segundo BARKSI et al. (1996) e JAY (2005), a produção de enterotoxinas geralmente está relacionada com cepas e/ou espécies de estafilococos produtoras das enzimas coagulase e termonuclease.

### 2.4 Técnicas bioquímicas e moleculares para identificação e diferenciação entre os estafilococos coagulase positiva

Durante muitos anos associou-se a capacidade de produzir coagulase, termonuclease e enterotoxinas apenas à *S. aureus*. Por isso, os testes laboratoriais para pesquisa de estafilococos, assim como as legislações que estipulavam os limites para bactérias patogênicas em alimentos, eram direcionadas, especificamente, para esta espécie (DOWNES & ITO, 2001; SILVA et al., 2001).

A mudança no conceito de associar intoxicação alimentar estafilocócica apenas à *S. aureus* começou com a descoberta de que outras espécies, como *S. hyicus* e *S. intermedius*, apresentavam capacidade de produzir enterotoxinas. Além disso, esses três microrganismos produzem coagulase e termonuclease e apresentam características morfológicas muito semelhantes, quando semeados em meios seletivos e diferenciais (GANDRA, et al., 2005).

Fatos como estes levaram à mudança da legislação brasileira, estabelecida pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) do Ministério da Saúde

(MS): pela legislação vigente (Brasil, RDC N° 12, de 2 de Janeiro de 2001), são estipulados limites para presença de Estafilococos coagulase positiva em alimentos, enquanto a anterior, (Brasil, Portaria. 451 de 19 de setembro de 1997), estipulava parâmetros para contagens de *S. aureus*.

Diversos trabalhos que utilizam testes bioquímicos para discriminar estafilococos coagulase positiva de interesse em alimentos têm sido publicados. ROBERSON et al. (1992), BRITO et al. (2002) e GANDRA et al. (2005) buscaram determinar um número mínimo de testes bioquímicos que pudessem ser utilizados para identificar e diferenciar *S. aureus*, *S. intermedius* e *S. hyicus* e verificaram que a resistência a acriflavina e a produção de  $\beta$ -galactosidase apresentam maior poder discriminatório, após a prévia obtenção de resultados positivos nos testes de coloração diferencial de Gram, produção de catalase, coagulase livre e/ou termonuclease.

Entretanto, segundo FARBER et al. (2001), os resultados de testes bioquímicos utilizados para identificação e biotipificação 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 pequena variabilidade genética e o risco de interpretações e identificações errôneas, quando se utiliza um número limitado de testes. De acordo com CREMONESI et al. (2005) os métodos microbiológicos tradicionais de avaliação da presença de patógenos em alimentos são limitantes, principalmente pela necessidade de um elevado tempo para a obtenção de um diagnóstico conclusivo, além do que, a identificação em nível de espécie não apresenta sensibilidade inteiramente satisfatória.

Métodos moleculares para diagnóstico de bactérias patogênicas em alimentos estão sendo utilizados como ferramentas mais rápidas e eficazes de diferenciação e identificação de microrganismos. O desenvolvimento da técnica de amplificação de segmentos de DNA utilizando a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) abriu enormes perspectivas em várias áreas do conhecimento (ZAHA et al., 2003). Esta técnica apresenta diversas vantagens em relação às técnicas 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 (NITSCHKO, 1999).

Na PCR, moléculas de DNA ou cDNA são enzimaticamente amplificadas milhares ou milhões de vezes de uma forma bastante rápida, permitindo obter milhões de cópias de um segmento específico de DNA através da ação de enzimas DNA polimerases e de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) sobre um DNA molde. Todo o procedimento é realizado *in vitro*. É uma técnica muito sensível que permite, a partir de uma quantidade mínima de amostra, a amplificação do DNA, em quantidade suficiente para análises posteriores. Na última década a PCR tornou-se o mais utilizado e popular método de biologia molecular utilizado em diagnóstico microbiológico (BOER & BEUMER, 1999; MALORNY et al., 2002).

#### 2.4.1 Multiplex PCR

Várias modificações da PCR foram descritas, dentre essas, destaca-se a PCR multiplex (mPCR), porque utiliza mais de um par de *primers* na mesma reação, possibilitando a amplificação simultânea de seqüências de DNA, portanto, mais de uma espécie bacteriana pode ser identificada na mesma PCR, promovendo uma análise mais ampla e mais rápida, quando comparada aos testes tradicionais de diagnóstico, e de menor custo quando comparada a outras técnicas moleculares (GANDRA, 2006). Exemplos de trabalhos que utilizaram mPCR para identificação de estafilococos foram os de GANDRA (2006), que utilizou esta técnica para detecção de *S. aureus*, *S. intermedius* e *S. hyicus* em leite; BARON et al. (2004), que diferenciaram entre as espécies *S. aureus* e *S. intermedius* através da amplificação do gene *nuc*; e VOYTENKO et al. (2006), que identificaram *S. hyicus* mediante amplificação do gene *sodA* e utilizaram como controle de amplificação a região 16S e 23S do rRNA.

Em todos esses trabalhos evidenciou-se a aplicabilidade da técnica mPCR para caracterização genética de cepas de Estafilococos coagulase positiva, demonstrando ser uma alternativa viável aos métodos imunológicos tradicionais de diagnóstico. Além disso, seu uso pode ser estendido para indústrias de alimentos,

assim como pode ser utilizado como ferramenta no auxílio à investigações epidemiológicas para a elucidação de casos e surtos de intoxicação alimentar.

#### 2.4.2 Controle Interno de Amplificação (IAC)

O maior inconveniente da maioria dos trabalhos de PCR publicados é não incluir um controle interno de amplificação (IAC) (HOORFAR et al., 2004). O IAC é uma seqüência não alvo colocada na reação e amplificada simultaneamente com a seqüência alvo, utilizada para impedir os resultados falsos negativos que possam ocorrer por inibidores da PCR (KLERKS et al., 2004). Em uma PCR sem IAC, uma resposta negativa (ausência de banda ou sinal) pode significar a ausência da seqüência alvo na reação, mas pode significar também que a reação foi inibida devido ao mau funcionamento do termociclador, mistura incorreta de PCR, baixa atividade da DNA polimerase, ou a presença de substâncias inibidoras na matriz da amostra (RADSTRÖM et al., 2003 apud HOORFAR et al., 2004). Já em uma PCR com um IAC, o sinal de controle deve sempre ser produzido mesmo que a seqüência alvo não esteja presente. Quando nem o sinal do IAC nem o sinal do alvo forem produzidos, a PCR falhou (HOORFAR et al., 2004).

O Comitê Europeu de Padronização (CEN), em colaboração com a Organização Internacional para Padronização (ISO), propôs um guia geral para a detecção de patógenos em alimentos por PCR, que requer a presença de IAC na reação (ANONYMOUS, 2002 apud HOORFAR et al., 2004).

Vários trabalhos reportam o uso de IAC, utilizando regiões variadas do genoma, como a região 16S e 23S do operon do RNA ribossômico, que é uma região altamente conservada entre as espécies, o gene *nuc*, que expressa a enzima termonuclease e está presente, principalmente, nas espécies de estafilococos que causam intoxicação alimentar, o gene *fem A* que codifica a proteína Fem A, envolvida na síntese da parede celular estafilocócica, dentre outras (BARON et al., 2004; MARTÍN et al., 2006; HWANG et al., 2007).



### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Microorganismos

Foram utilizadas cepas padrão de *Staphylococcus aureus* (FRI 326, FRI 361 e FRI-472) e isolados das três espécies coagulase positiva, provenientes de leite de vacas com mastite subclínica. Todos os isolados foram identificados bioquimicamente através da avaliação da resistência à acriflavina e produção de catalase, coagulase livre e  $\beta$ -galactosidase, conforme descrito por ROBERSON et al. (1992), BRITO et al. (2002) e GANDRA et al. (2005). Como controle negativo foram utilizadas cepas padrão das espécies *Staphylococcus lugdunensis* e *Staphylococcus warneri* cedidas pela Universidade Estadual de Londrina e *Listeria monocytogenes* (ATCC 764). Todas as bactérias pertencem ao banco de cepas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial (DCTA) da Faculdade de Agronomia “Eliseu Maciel” (FAEM) da Universidade Federal de Pelotas (UFPel), e foram mantidas em ágar TSA (ágar Soja Triptona– TSA, Acumedia) sob refrigeração ( $\leq 4^{\circ}\text{C}$ ), até o momento do uso.

#### 3.2 Identificação bioquímica de cepas de Estafilococos Coagulase Positiva

##### 3.2.1 Meios de cultura, soluções, reagentes e outros

- a) acriflavina, Sigma;
- b) ágar Baird-Parker (ABP), Oxoid, suplementado com solução aquosa de telurito de potássio a 1% e de solução ovo-salina;

- c) ágar DNA Azul de Toluidina, Acumedia;
- d) ágar Infusão Cérebro Coração (BHA), Acumedia;
- e) ágar Tríplice Açúcar e Ferro (TSI), Acumedia;
- f) ágar Soja Triptona (TSA), Acumedia;
- g) álcool etílico absoluto, Nuclear;
- h) caldo Infusão Cérebro Coração (BHI), Acumedia;
- i) caldo Púrpura de Bromocresol, Oxoid;
- j) hidróxido de potássio (KOH), Reagen;
- k) ortonitrofenil-β-D- galactopiranosídeo (ONPG), Sigma;

### **3.2.2 Testes bioquímicos para identificação de Estafilococos Coagulase Positiva**

Foram realizados os testes propostos por ROBERSON et al. (1992), BRITO et al. (2002) e GANDRA et al. (2005), os quais incluíram coloração de Gram, catalase, coagulase livre e/ou termonuclease, seguidos de teste de resistência à acriflavina e de produção de β-galactosidase. As cepas padrão foram usadas como controles positivos e também foram bioquimicamente identificadas.

#### **3.2.2.1 Coloração diferencial de Gram e produção de catalase**

Foram realizados de acordo com os procedimentos propostos por KONEMAN et al. (2001).

#### **3.2.2.2 Produção de coagulase livre**

O teste foi realizado de acordo com o método proposto pela AOAC (1990). Foi utilizado plasma de coelho, coletado por punção cardíaca em animais pertencentes ao Biotério da UFPel. O plasma foi mantido, em tubos estéreis, sob refrigeração ( $\leq 4^{\circ}\text{C}$ ) até o momento do uso. Para a realização do teste, o isolado a ser

identificado foi cultivado em BHI (4ml) e incubado á 37°C por 24 horas. Foram, então, transferidos 0,5mL de BHI de cada isolado, para microtubos contendo 0,3mL de plasma de coelho e, então, incubados á 37°C. As leituras foram realizadas em intervalos de uma hora, por um período de oito horas, com uma leitura final 24 horas após a inoculação. A leitura foi realizada de acordo com LANCETTE & TATINI (1992), avaliando-se a intensidade do coágulo formado e considerando-se como positivas as culturas com resultados entre 3+ e 4+. Aquelas que apresentavam reações de nível 1+ ou 2+ foram aceitas apenas quando apresentaram resultados positivos nos testes adicionais de catalase, termonuclease e Gram.

### **3.2.2.3 Resistência à acriflavina**

Ágar Baird-Parker foi suplementado com acriflavina (após esterilização e antes do plaqueamento) de modo a obter uma concentração final de  $7\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  de acriflavina no meio. Após, os isolados foram semeados por esgotamento a partir de crescimento em caldo BHI (24 horas á 37°C) e incubados á 37°C por 24 a 48 horas. Isolados que cresceram em meio contendo acriflavina foram considerados resistentes, indicando resultado positivo (ROBERSON et al., 1992).

### **3.2.2.4 Produção de $\beta$ -galactosidase**

A produção de  $\beta$ -galactosidase foi determinada de acordo com MURRAY et al. (1999), empregando-se como substrato o ortonitrofenil- $\beta$ -D- galactopiranosídeo (ONPG). A partir de um cultivo recente em meio TSA do isolado a ser testado, foram inoculadas várias colônias em 0,5mL de caldo ONPG e incubou-se em banho-maria a 37°C por uma hora. Os resultados foram interpretados baseados na mudança de cor do meio, de incolor para amarelo (resultado positivo), ou pela ausência de mudança de coloração (resultado negativo).

### 3.3 Extração de DNA e identificação molecular de cepas de Estafilococos Coagulase Positiva

#### 3.3.1 Meios de cultura, soluções, reagentes e outros

- a) ágar Baird-Parker (ABP), Oxoid, suplementado com solução aquosa de telurito de potássio a 1% e de solução ovo-salina;
- b) ágar Soja Triptona (TSA), Acumedia;
- c) água ultrapura esterilizada;
- d) solução tampão Tris-EDTA – A (TE-A) pH 7,8;
  - 10 mM Tris base, Gibco BRL
  - 5 mM EDTA, Pharmacia
- e) Solução tampão Tris-EDTA – B (TE-B) pH 7,8;
  - 50 mM Tris base, Gibco BRL
  - 20 mM EDTA, Pharmacia
- f) Solução de tampão acetato, 20mM;
  - ácido acético 20mM, Synth
  - acetato de sódio anidro 20mM, Synth
- g) solução de ácido acético, 20 mM, Fatec;
- h) solução de acetato de sódio, 20 mM, Sigma;
- i) solução de lisostafina ( $100 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ ), Sigma L-7386, em tampão acetato 20mM;
- j) solução de dodecil sulfato de sódio (SDS), Pharmacia, 20% (p/v) em TE-B;
- k) solução de Proteinase K, Sigma,  $20\text{mg}.\text{mL}^{-1}$ ;
- l) solução de cloreto de sódio 5M, Fatec;
- m) solução fenol – clorofórmio – álcool isoamílico ultrapuro, 25:24:1, USB;
- n) álcool etílico absoluto, Nuclear;
- o) RNase A, England Biolabs,  $20 \text{mg}.\text{mL}^{-1}$ ;
- p) solução tampão 10 X para PCR, sem magnésio, Invitrogen;
- q) solução 50 mM de cloreto de magnésio, Invitrogen;
- r) solução de 10 mM de dNTP mix, Invitrogen;

- s) solução de *Taq* DNA polimerase, Invitrogen, 5U.µL<sup>-1</sup>;
- t) 10 pM de cada um dos *primers* para o gene da termonuclease (sintetizados pela Invitrogen);
- u) 1pM de cada um dos *primers* para região 16S do rRNA (sintetizados pela Invitrogen);
- v) agarose ultrapura, Invitrogen;
- x) solução de brometo de etídio, Pharmacia, 10 mg.mL<sup>-1</sup>;
- y) solução corante (tampão de carga ou de amostra) para eletroforese a base de bromofenol e glicerol;
- z) padrões de peso molecular, 100 pb DNA Ladder e λ DNA/*Hind* III, Invitrogen.

### 3.3.2 Equipamentos

- a) banho-maria, Stovall Life Science;
- b) centrífuga refrigerada, CS –15R, Beckman;
- c) Biologic Oxygen Demand – B.O.D. TE-391, Tecnal;
- d) balança analítica digital, Monobloc PB 3002-S;
- e) espectrofotômetro UV/visível, Ultrospec 2000, Pharmacia Biotech;
- f) aparelho termociclador, Master Cycler Gradient, Eppendorff;
- g) cuba para eletroforese horizontal, Biolabs;
- h) fonte geradora de tensão para eletroforese, FB 300, Fishbiotech;
- i) sistema para fotodigitalização Digidoc II System, Bioimaging System.

### 3.3.3 Extração de DNA

A extração de DNA cromossomal dos Estafilococos Coagulase Positiva e das cepas padrão de *S. warneri* e *S. lugdunensis* foi realizada de acordo com o protocolo proposto por MATTHEWS et al. (1997), com modificações.

Primeiramente, várias colônias da cultura dos isolados de *Staphylococcus* spp. em TSA foram transferidas para 100µL de tampão TE-A, até turbidez 1,0 da

escala de MacFarland. A lise do peptídeoglicano da parede celular era feita pela adição de 100µL de solução de lisostafina e incubação á 37°C em banho-maria, por 45 minutos. Para completar a lise celular, adicionou-se, em seqüência, 20µL de tampão TE-B, contendo 20% de SDS, e 3µL de solução de proteinase K e incubou-se, novamente, em banho maria a 37°C por 1 hora. Adicionou-se, então, 200µL de solução NaCl 5M e agitou-se, manualmente, por 15 segundos. O material intracelular foi separado por centrifugação á 16000g por 15 minutos á 4°C e transferiu-se o sobrenadante para um novo microtubo. Adicionou-se, então, fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1) para a liberação e separação de proteínas, etapa esta completada por centrifugação a 16000g por 15 minutos, transferindo-se o sobrenadante para um novo microtubo. A precipitação do DNA foi realizada com 400µL de álcool etílico absoluto gelado, e manutenção em -20°C por toda a noite. Após este período, foi realizada nova centrifugação, á 16000g por 10 minutos, mantendo-se o *pellet* formado. Para aumentar a pureza do material extraído, lavou-se o *pellet* com álcool etílico 70%, centrifugou-se á 16000g por 10 minutos, descartou-se o sobrenadante e colocou-se para secar *em* B.O.D. a temperatura de 37°C até evaporação completa do álcool. Após, ressuspendeu-se o *pellet* em 30µL de água ultrapura estéril e 2µL de RNase e incubou-se a 37°C por 1 hora, para aumentar a pureza do material extraído. A extração de DNA de cada cepa foi realizada, no mínimo, duas vezes, com cultivos diferentes, sendo todas as amostras de DNA submetidas a amplificação por mPCR.

O DNA genômico de *Listeria monocytogenes* foi extraído conforme método adaptado a partir de SAMBROOK & RUSSELL (2001).

### 3.3.4 Estimativa da concentração do DNA obtido

Uma alíquota de 7µL do DNA, juntamente com 3µL de tampão de carga, foram submetidos á eletroforese em gel de agarose 1%, simultaneamente com o padrão de peso molecular λ DNA/*Hind* III. A intensidade da luminescência da amostra de DNA extraída foi comparada visualmente à luminescência das bandas do padrão de peso molecular e a concentração de DNA (ng. µL<sup>-1</sup>) foi estimada comparativamente.

### 3.3.5 Amplificação de seqüências dos genes *nuc* e 16S *rRNA*

Para a amplificação de seqüências do gene *nuc* utilizou-se os *primers* NUC1, NUC2, NUC5, NUC6, NUC7 e NUC8. Para a amplificação de uma seqüência do gene que codifica para o 16S do RNA ribossomal foram utilizados os *primers* 16S1 e 16S2.

#### 3.3.5.1 *Primers*

Os *primers* NUC1 e NUC2, NUC5 e NUC6, utilizados para identificação e diferenciação molecular de *S. aureus* e *S. intermedius*, respectivamente, foram os mesmos utilizados por GANDRA (2006). Os *primers* utilizados para amplificação do IAC (16S1 e 16S2) foram os descritos por BARON et al. (2004). Para a identificação de *S. hyicus* foram desenhados *primers*, específicos para esta espécie, utilizando o *software* Vector NTI INC, baseados em seqüências completas do gene *nuc*, obtidas no GenBank/NCBI (número de acesso L23973.1 e Gi 532653). As seqüências selecionadas foram alinhadas entre si e com as seqüências dos genes das outras duas espécies de ECP e do IAC, utilizando o *software* Blast (GenBank/NCBI) para verificar a similaridade entre elas. Os *primers* foram desenhados de forma a anelarem nas regiões não homólogas, para garantir especificidade e possibilitar amplificações espécie-específicas.

A seqüência dos oligonucleotídeos (*primers*) utilizados, assim como o tamanho do produto de amplificação estimado e a espécie alvo são mostrados na tabela 1.

Tabela 1: *Primers* utilizados para identificação, diferenciação molecular e controle interno de amplificação de *S. aureus*, *S. intermedius* e *S. hyicus*, seqüência de bases, número de pares de bases (pb) estimados para o gene da termonuclease para as espécies alvo e para o IAC.

| <i>Primer</i> | Seqüência 5' - 3'      | Tamanho do produto de amplificação (pb) | Alvo                  |
|---------------|------------------------|---|-----------------------|
| NUC1*         | ATGAAGTCAAATAAATCGCT   | 458                                     | <i>S. aureus</i>      |
| NUC2*         | TTTGGTGAAAAATACTTCTC   |   |                       |
| NUC5*         | GAAAAAAATTACAACAGGCG   | 106                                     | <i>S. intermedius</i> |
| NUC6*         | CACATCCGTTGAAGACTTTT   |   |                       |
| NUC7          | TAAGACACCGATAAAAGCCC   | 740                                     | <i>S. hyicus</i>      |
| NUC8          | TTGTTTTTGTGCTTGTCTATAC |   |                       |
| 16S1**        | GGACGGGTGAGTAACACGTGG  | 252                                     | IAC***                |
| 16S2**        | TCCCGTAGGAGTCTGGACCGT  |   |                       |

\* Gandra et al., 2006

\*\* Baron et al., 2004

\*\*\* Internal Amplification Control

### 3.3.6 Reação uniplex PCR

Para a calibração da mPCR foram realizadas uniplex PCR utilizando DNA's de cada uma das espécies de ECP por reação. A solução da reação foi preparada com 50ng do DNA extraído, 10pM de cada *primer*, 10µM de dNTP mix, 1U de *Taq* DNA Polimerase, 50mM de MgCl<sub>2</sub> e tampão para PCR, perfazendo um total de 25µL por reação. A mistura foi submetida a 94°C por 4 minutos, para a desnaturação inicial do DNA e, posteriormente, amplificada por 30 ciclos, onde cada ciclo consistia de desnaturação por 2 minutos a 95°C, anelamento dos *primers* por 2 minutos a 55°C, síntese da cadeia complementar (extensão) por 2 minutos a 72°C e, por fim, extensão final por 7 minutos a 72°C.



### 3.3.7 Multiplex PCR

As soluções de reação foram preparadas contendo 50ng do DNA de cada bactéria. Foram adicionados, ainda, 10pM de cada *primer* para o gene da termonuclease e 1pM para o gene 16S do rRNA (tabela 1), 10 µM de dNTP mix, 1U de Taq DNA Polimerase, 50mM de MgCl<sub>2</sub> e tampão de PCR 10X, perfazendo um volume total de 25µL. A mistura foi submetida a 94°C por 4 minutos e, posteriormente, amplificada por 30 a 40 ciclos, onde cada ciclo consistia de 2 minutos a 95°C, 2 minutos em um gradiente que variou de 49°C a 55°C, 2 minutos a 72°C e, por fim, 7 minutos a 72°C.

### 3.3.8 Visualização e análise dos produtos amplificados

Uma alíquota de 10µL dos produtos da PCR foi retirada, à qual foi adicionado 2µL de tampão de carga. Para separação dos produtos amplificados foi realizada eletroforese (150V, 80mA, 50 min) em gel de agarose 1% (p/v) em tampão TBE, pH 8,4, corado com 0,5µg.mL<sup>-1</sup> de brometo de etídeo (DILLON et al., 1985 apud SILVA, 1998). A visualização das bandas no gel e a fotodigitalização foram realizadas em transiluminador com luz ultravioleta, sendo o tamanho dos fragmentos amplificados verificado através de comparação visual com os padrões de peso molecular (100bp DNA Ladder).

### 3.3.9 Sequenciamento de DNA

Os produtos das PCR's foram purificados de acordo com o protocolo de purificação com PEG (polietileno glicol) e seqüenciados utilizando o seqüenciador de DNA MegaBACE (Amershan Biosciences). As seqüências obtidas foram compiladas e analisadas utilizando-se o programa de alinhamento de seqüências ContigExpress (Informax inc.) e alinhados utilizando-se o programa Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), localizado no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Identificação e diferenciação bioquímica entre as espécies de estafilococos coagulase positiva

Os testes bioquímicos são muito utilizados na rotina laboratorial, para identificação e biotipificação bacteriana. Estes apresentam diversas desvantagens, como baixo poder discriminatório em microrganismos com pequena variabilidade genética e risco de interpretações e identificações errôneas, quando se utiliza um número limitado de testes (FARBER et al., 2001, HUSSAIN et al., 2008). Porém, segundo HUSSAIN et al. (2008), a maior dificuldade associada a esses métodos deve-se a expressão gênica, cuja variabilidade pode modificar as características fenotípicas. Neste trabalho, evidenciaram-se estas dificuldades, pois, dos 16 isolados de ECP que foram submetidos à identificação bioquímica, visando diferenciar as espécies *S. aureus*, *S. intermedius* e *S. hyicus* através dos testes de resistência à acriflavina e produção da enzima  $\beta$ -galactosidase, três apresentaram resistência à acriflavina e produziram  $\beta$ -galactosidase concomitantemente, o que não permitiu que esses três isolados fossem identificados quanto à espécie, pois não era previsto no sistema de identificação proposto. Este resultado pode se dever ao fato de que no teste de produção de  $\beta$ -galactosidase há possibilidade de ocorrências de falsos positivos quando se trabalha com colônias de *S. aureus* com forte pigmentação amarela, uma vez que a avaliação da positividade do teste se dá pela mudança de coloração do meio, de incolor para amarelo.

Dez isolados apresentaram resistência à acriflavina e não produziram a enzima  $\beta$ -galactosidase, dois foram  $\beta$ -galactosidase positiva e sensíveis a acriflavina, e um apresentou sensibilidade à acriflavina e não produziu a enzima  $\beta$ -galactosidase, o que os caracteriza como *S. aureus* (10), *S. intermedius* (2) e *S. hyicus* (1), respectivamente (tabela 2).

De acordo com ROBERSON et al. (1992), CAPURRO et al. (1999), BRITO et al. (2002) e GANDRA et al. (2005), os testes de resistência à acriflavina e produção de  $\beta$  –galactosidase são altamente discriminatórios para diferenciar espécies de ECP, o que não foi verificado neste estudo.. Aqueles autores verificaram que 100% das cepas de *S. intermedius* foram produtoras de  $\beta$  –galactosidase, enquanto nenhuma cepa de *S. aureus* e *S. hyicus* produziu essa enzima; além disso, 100% das cepas de *S. aureus* foram resistentes à acriflavina, enquanto as demais espécies de ECP apresentaram sensibilidade.

## 4.2 Identificação e diferenciação molecular entre as espécies de estafilococos coagulase positiva

### 4.2.1 Especificidade dos *primers*

Formatado: Fonte: Itálico

Primeiramente foram realizadas reações uniplex-PCR para confirmar a especificidade de cada par de *primers*, verificando-se que os *primers* NUC1 e NUC2 foram específicos para *S. aureus*, pois nas reações em que o DNA desta espécie microbiana foi utilizado, obteve-se a amplificação do fragmento estimado de 458 pares de base (pb), como pode ser visualizado na figura 1.

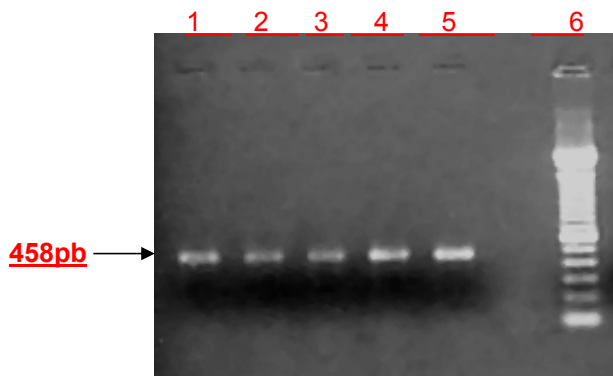


Figura 1 – Produtos da uniplex PCR obtidos com os primers NUC1 e NUC2 e DNAs de *S. aureus*, visualizados em gel de agarose (1%). Pista 1 – 3: *S. aureus* FRI 326, FRI 361e FRI 472; pista 4 e 5: *S. aureus* de origem clínica; pista 6 – marcador de peso molecular *Ladder* 100pb Biolabs®.

Outros autores também utilizaram o gene *nuc* como alvo para identificação molecular de *S. aureus*. GANDRA (2006), relata que esse gene foi específico para detecção dessa bactéria, e KALOREY et al. (2007), visando caracterizar genotipicamente 37 isolados de *S. aureus*, obtiveram a amplificação deste gene em 36 dos isolados, demonstrando novamente alta especificidade.

YANG et al. (2007) também utilizaram o gene da termonuclease em uma PCR para a detecção de *S. aureus* e compararam os resultados com Baird-Parker + ágar RPF, GB- 4789.10-94 e Petrifilm RSA.Count Plate, encontrando 100% de concordância com os testes bioquímicos, demonstrando o potencial de utilização deste gene para a identificação de espécies de estafilococos.

Os primers NUC5 e NUC6 foram específicos para *S. intermedius*, uma vez que houve a amplificação do fragmento estimado de 106pb quando o DNA de *S. intermedius* foi utilizado (figura 2).

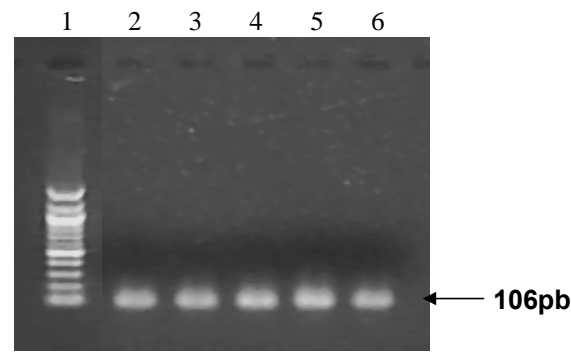


Figura 2 – Produtos da uniplex PCR obtidos com os primers NUC5 e NUC6 e DNAs de *S. intermedius*, visualizados em gel de agarose (1%). Pista 1 – marcador de peso molecular Ladder 100pb Biolabs®; pista 2 – 6: *S. intermedius* de origem clínica.

SILVA et al. (2003), também utilizaram o gene *nuc* como alvo para identificação de *S. intermedius* e conseguiram diferenciar essa espécie de *S. aureus* e de *S. hyicus*. Entretanto, diferentemente do presente estudo, juntamente com o fragmento estimado, houve a presença de diversas bandas inespecíficas, dificultando a identificação. BECKER et al. (2005) amplificaram seqüências do gene *nuc* para identificação desse microrganismo e encontraram 94,9% de especificidade, e também relataram a presença de bandas inespecíficas. Já BARON et al. (2004), utilizaram seqüências desse gene para diferenciação entre *S. aureus* e *S. intermedius* e obtiveram 100% de discriminação.

Os primers NUC7 e NUC8 foram específicos para *S. hyicus*, uma vez que houve a amplificação do fragmento estimado de 740pb sempre que o DNA desta espécie microbiana foi submetido a PCR (figura 3).

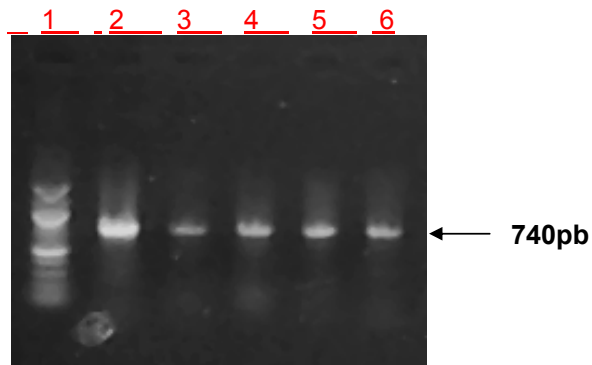
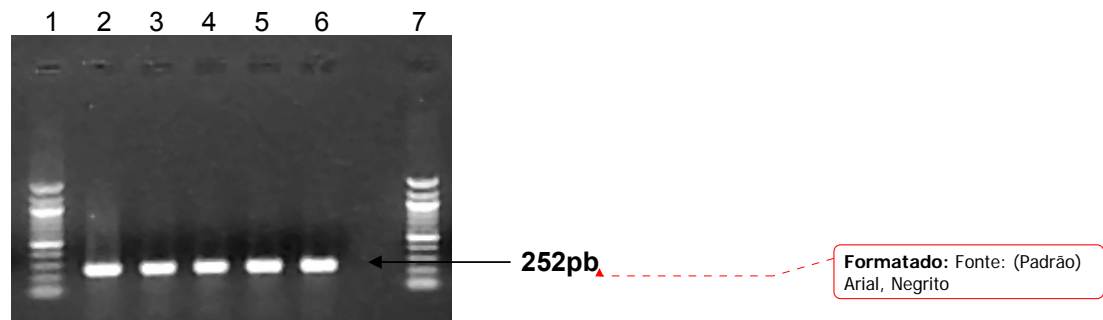


Figura 3 – Produtos da uniplex PCR obtidos com os primers NUC7 e NUC8 e DNAs de *S. hyicus*, visualizados em gel de agarose (1%). Pista 1 – marcador de peso molecular Ladder 100pb Biolabs®; pista 2 – 6: *S. hyicus* de origem clínica.

Para *S. hyicus*, o número de publicações descrito na literatura é limitado, havendo poucos trabalhos com a utilização de seqüências do gene *nuc* para sua identificação. Desses, destacam-se os estudos conduzidos por SILVA et al. (2003) e por GANDRA (2006), que também relataram a potencialidade do gene *nuc* como marcador molecular específico para esse microrganismo. Entretanto, outros genes têm sido propostos como alvo, como por exemplo, os que codificam as toxinas esfoliativas ExhA, ExhB, ExhC e ExhD (ANDRESEN & AHRENS, 2004), e o gene *sodA*, que codifica a enzima superóxido dismutase A (VOYTENKO et al., 2006).

Para os primers controle 16S1 e 16S2, não houve diferença com relação aos outros três conjuntos de primers, pois também apresentaram alta especificidade para *Staphylococcus* sp. (figura 4), não ocorrendo amplificação do produto esperado em outros gêneros bacterianos.

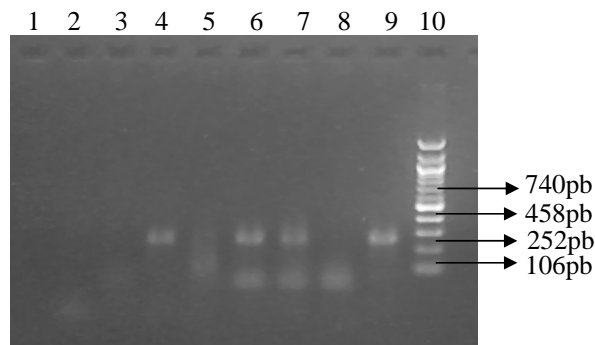


**Figura 4 – Produtos** da uniplex PCR **obtidos com os primers 16S1 e 16S2** e DNAs de estafilococos, **visualizados em gel de agarose (1%)**. **Pista 1 e 7 – marcador de peso molecular Ladder 100pb Biolabs®**; **pista 2: *S. aureus***; **pista 3: *S. intermedius***; **pista 4: *S. hyicus***; **pista 5: *S. warnery***; **pista 6: *S. lugdunensis***.

A região 16S do rRNA também tem sido utilizada por outros autores como controle de amplificação interno (IAC) em PCR para identificação de estafilococos por ser altamente conservada entre as espécies desse gênero bacteriano. BARON et al. (2004) desenvolveram um mPCR para diferenciar entre as espécies *S. aureus* e *S. intermedius* através da amplificação do gene da termonuclease, incluindo como IAC a região 16S do rRNA, e obtiveram 100% de amplificação da seqüência controle para todas as espécies de estafilococos, mostrando ser um bom marcador de amplificação para estes microrganismos. STROMMINGER et al. (2003) também obtiveram boa especificidade quando utilizaram a região 16S do rRNA como controle positivo para identificação de espécies de estafilococos, onde ocorreu amplificação dessa região em 100% das cepas. Já **MAES et al. (2002)**, **desenharam primers** para essa região para ser utilizado como IAC em PCR para identificação de estafilococos em amostras de sangue e encontraram 98% de especificidade.

#### 4.2.2 Padronização do Multiplex PCR (mPCR)

Quando o mPCR foi realizado nas mesmas condições que o uniplex PCR não houve a amplificação de alguns fragmentos (Figura 5).



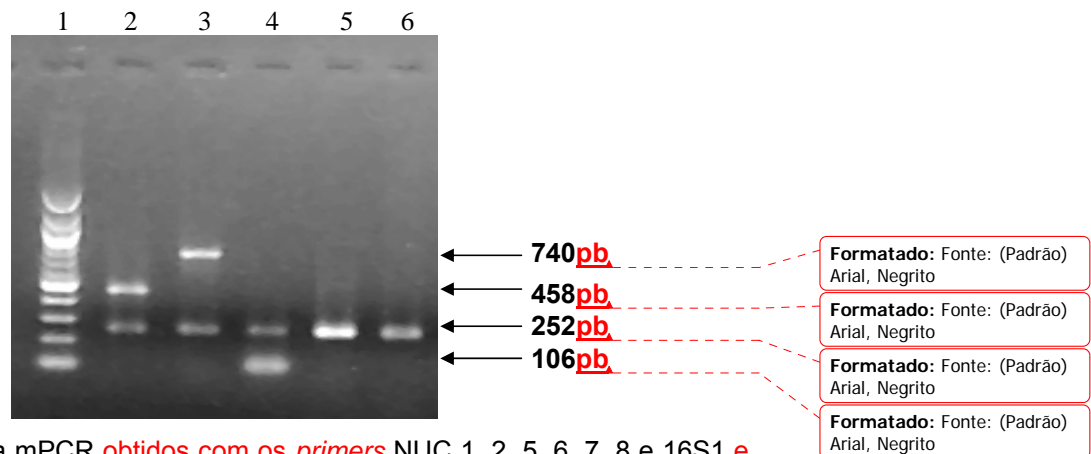
**Figura 5 – Produtos** da mPCR **obtidos com os primers** NUC 1, 2, 5, 6, 7, 8 e 16S1\_e 16S2, **visualizados em gel de agarose (1%).** **Pista 1 –** Produto de mPCR obtidos com *Listeria monocytogenes*; **pista 2 e 3 –** Produtos de mPCR obtidos com isolados clínicos de *S. hyicus*; **pista 4 e 5 –** Produtos de mPCR obtidos com isolados de *S. intermedius*; **pista 6 e 7 –** Produtos de mPCR obtidos com *S. aureus* FRI 326; **pista 8 –** Produto de mPCR obtidos com *S. warneri*; **pista 9 –** Produto de mPCR obtidos com *S. lugdunensis*; **pista 10 -** **marcador de peso molecular Ladder 100pb Biolabs®.**

Como se pode verificar na Figura 5, houve amplificação de fragmentos do gene controle nas pistas 4, 6, 7 e 9 e, na pista 5, houve uma fraca amplificação da seqüência do gene da termonuclease de *S. intermedius*, não havendo a amplificação dos demais genes das outras espécies de estafilococos. BAILEY & SCOTT'S (2002) afirmam que a adição de mais de um par de *primers* numa mesma PCR (mPCR), pode causar interferência no processo de amplificação, assim como as condições de otimização podem ser dificultadas. TAMARAPU et al. (2001), afirmam que essa redução na especificidade do teste pode ocorrer devido a uma “competição” entre os pares de *primers* da reação. Além disso, SANCHEZ et al. (2003), relatam que quando vários pares de *primers* são utilizados simultaneamente numa PCR, pode não ocorrer amplificações dos fragmentos desejados.

Em vista do exposto, houve a necessidade de otimizar as condições da mPCR e, para isso, foram testados diferentes números de ciclos que variaram de 30 a 40, diferentes temperaturas de anelamento dos *primers* (entre 49 e 55°C) e diferentes concentrações dos *primers*. Não houve diferença quando a reação foi submetida a distintos números de ciclos, entretanto, a alteração nas temperaturas de



anelamento e na concentração dos *primers* foi fundamental para que se conseguissem ampliações de qualidade. A temperatura que produziu melhores ampliações foi 52°C, entretanto, em algumas ampliações a seqüência controle se sobressaía em relação às demais seqüências, havendo a necessidade de mudar a concentração dos *primers* do IAC, de 10pmol para 1pmol, a qual foi adotada como padrão. Nas figuras 6 e 7 são apresentados os resultados obtidos na determinação das condições ótimas para o mPCR.



**Figura 6 – Produtos** da mPCR **obtidos com os primers** NUC 1, 2, 5, 6, 7, 8 e 16S1\_e 16S2 e DNAs de estafilococos, **visualizados em gel de agarose (1%).** **Pista 1 = marcador de peso molecular Ladder 100pb Biolabs®;** pista 2 – *S. aureus* FRI 326; pista 3 – *S. hyicus* de origem clínica; pista 4 – *S. intermedius* de origem clínica; pista 5 – *S. warneri*; pista 6 – *S. lugdunensis*.



**Figura 7 – Produto da mPCR obtidos com os primers NUC 1, 2, 5, 6, 7, 8 e 16S1 e 16S2 e DNAs dos três ECP na mesma reação, visualizados em gel de agarose (1%). Pista 1 – marcador de peso molecular Ladder 100pb Biolabs®; pista 2 – *S. aureus* FRI 326, *S. hyicus* de origem clínica, *S. intermedius* de origem clínica.**

A temperatura de anelamento dos *primers* (52°C) padronizada neste estudo não foi a mesma utilizada por BARON et al. (2004) e GANDRA (2006), os quais utilizaram o mesmo conjunto de *primers* deste estudo para a região 16S do rRNA e *nuc* 1 e 2, 5 e 6 respectivamente. A temperatura utilizada por eles foi de 55°C.

A necessidade de otimizar temperaturas de anelamento em mPCR também foi relatada por SANCHEZ et al. (2003), os quais desenvolveram duas reações multiplex para a detecção de cepas de *Staphylococcus aureus* enterotoxigênicos. Os autores reportaram que, para ambas as reações, foi necessário testar diversas temperaturas de anelamento até estabelecer as mais apropriadas e descreveram que baixas temperaturas de anelamento podem originar reações com pouca especificidade devido à competição entre produtos não específicos pelos componentes da reação.

GANDRA (2006) relatou a necessidade de otimizar as temperaturas de anelamento, principalmente para detecção de *S. intermedius*, no qual verificou uma grande variabilidade no tamanho dos fragmentos amplificados e atribuiu este polimorfismo às condições da reação adotada, as quais estavam possibilitando

amplificações inespecíficas e/ou poderiam estar permitindo a ligação dos *primers* a outras sequências similares ou parcialmente similares.

Com relação à concentração de *primers*, CREMONESI et al. (2005), utilizando uma mPCR para identificação de *Staphylococcus aureus* enterotoxigênicos isolados de leite e de produtos lácteos, verificaram que esse parâmetro foi o fator de maior importância na qualidade da amplificação.

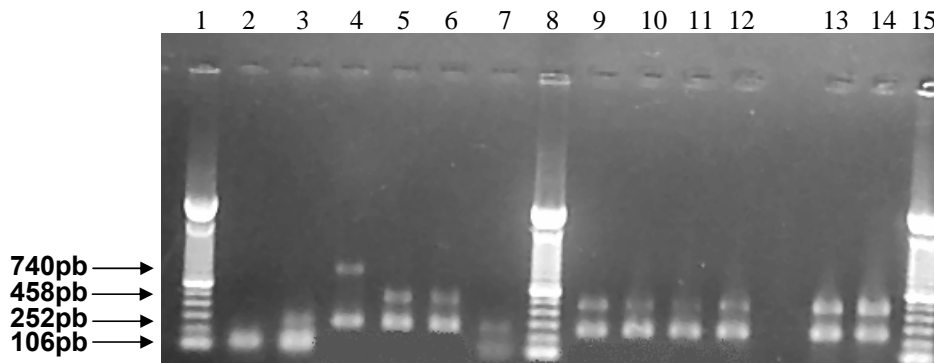
#### **4.2.3 Análise das seqüências dos produtos de PCR**

Na análise das seqüências dos produtos das PCRs, foi possível observar que as seqüências do Controle Interno de Amplificação apresentaram 93, 96, 99 e 100% de similaridade com a do gene 16S do rRNA de *S. intermedius*, *S. hyicus*, *S. lugdunensis* e *S. aureus* respectivamente, ou seja, apresentaram bom potencial como marcador para o gênero Estafilococos. As seqüências dos fragmentos de DNA de 740pb (*S. hyicus*) e 458pb (*S. aureus*) amplificados por PCR apresentaram 98% de similaridade com as seqüências dos genes *nuc* das respectivas espécies depositadas no GenBank. Entretanto, não foi possível seqüenciar o fragmento do gene *nuc* de *S. intermedius* proposto neste estudo, em função de seu pequeno tamanho (106pb), haja visto que, nessa técnica, as primeiras e últimas bases da seqüência são perdidas.

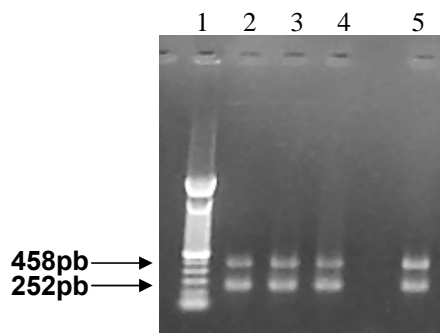
#### **4.2.4 Utilização do mPCR em isolados de ECP**

Foram utilizados 16 isolados ECP, provenientes de leite de vacas com mastite subclínica, e duas cepas padrão como controle negativo para o gene da termonuclease (*S. warneri* e *S. lugdunensis*). Dentre os 16 isolados, houve amplificação dos fragmentos do gene da região 16S do rRNA (IAC) em 15 e nos dois isolados utilizados como controle positivo, o que comprova sua utilidade como um controle interno de amplificação. Resultados semelhantes foram encontrados por BARON et al. (2004), ZHANG et al. (2004) e VOYTENKO et al. (2006), que utilizaram a mesma região 16S do rRNA de Estafilococos como controle da reação e

obtiveram 100% de amplificação das seqüências desse gene. Através da mPCR, foi possível identificar um dos isolados como *S. hyicus*, três como *S. intermedius* e 12 como *S. aureus*. Os resultados podem ser visualizados nas Figuras 8 e 9 e Tabela 2.



**Figura 8** – Produto da mPCR obtidos com os primers NUC 1, 2, 5, 6, 7, 8 e 16S1\_e 16S2 e DNAs de estafilococos, visualizados em gel de agarose (1%). Pista 1, 8 e 15 – marcador de peso molecular Ladder 100pb Biolabs®; pista 2 a 7, 9 a 14 – isolados de *S. aureus* (458pb), *S. hyicus* (740pb) e *S. intermedius* (106pb).



**Figura 9** – Produto da mPCR obtidos com os primers NUC 1, 2, 5, 6, 7, 8 e 16S1\_e 16S2 e DNAs de estafilococos, visualizados em gel de agarose (1%). Pista 1 – marcador de peso molecular Ladder 100pb Biolabs®; pista 2 a 5 – isolados de *S. aureus*

Como é possível observar na figura 8, pistas 2, 3 e 7 houve a amplificação do fragmento de aproximadamente 106pb que corresponde ao gene *nuc* de *S. intermedius*. Salienta-se que na pista 2, não houve a amplificação do fragmento de 252pb correspondente ao IAC, sendo esta a única reação em que não houve amplificação deste controle. Na pista 4 há a presença de duas bandas, uma com aproximadamente 252pb (IAC) e outra com 740pb a qual representa o fragmento estimado para o gene *nuc* de *S. hyicus*. Nas demais pistas da figura 8, e na Figura 9, houve amplificação do IAC e de um fragmento de aproximadamente 458pb, indicativo do gene *nuc* de *S. aureus*.

Através desses resultados pode-se verificar que todos os 16 isolados foram identificados em nível de espécie, sendo três *S. intermedius*, um *S. hyicus* e 12 *S. aureus*.

#### **4.3 Comparação entre os testes bioquímicos e mPCR para identificação de ECP**

Neste estudo avaliou-se a resistência a acriflavina e a capacidade de produção de  $\beta$ -galactosidase, tendo em vista que há relatos na literatura de que esses testes seriam suficientemente discriminatórios para diferenciar *S. aureus*, *S. hyicus* e *S. intermedius* ([ROBERSON et al., 1992](#); [CAPURRO et al., 1999](#); [BRITO et al., 2002](#); [GANDRA et al., 2005](#)). Entretanto, observou-se que três dos 16 isolados (18,7%) não puderam ser identificados em nível de espécie.

Por outro lado, o mPCR proposto permitiu a identificação de todos os isolados, demonstrando um maior poder discriminatório que os testes bioquímicos para identificação das três espécies de ECP, como pode ser visualizado na tabela 2. Os três isolados não identificados pelos testes bioquímicos foram caracterizados pelo mPCR como *S. aureus* (isolados 5 e 6) e *S. intermedius* (isolado 4).

Tabela 2 – Comparação entre testes bioquímicos e mPCR para identificação de *S. aureus*, *S. hyicus* e *S. intermedius*

| Isolado | Resistência a acriflavina | Produção de $\beta$ -galactosidase | Identificação bioquímica | Identificação molecular (mPCR) |
|---------|---------------------------|------------------------------------|--------------------------|--------------------------------|
| 1       | -                         | -                                  | <i>S. hyicus</i>         | <i>S. hyicus</i>               |
| 2       | -                         | +                                  | <i>S. intermedius</i>    | <i>S. intermedius</i>          |
| 3       | -                         | +                                  | <i>S. intermedius</i>    | <i>S. intermedius</i>          |
| 4       | +                         | +                                  | Não identificado         | <i>S. intermedius</i>          |
| 5       | +                         | +                                  | Não identificado         | <i>S. aureus</i>               |
| 6       | +                         | +                                  | Não identificado         | <i>S. aureus</i>               |
| 7       | +                         | -                                  | <i>S. aureus</i>         | <i>S. aureus</i>               |
| 8       | +                         | -                                  | <i>S. aureus</i>         | <i>S. aureus</i>               |
| 9       | +                         | -                                  | <i>S. aureus</i>         | <i>S. aureus</i>               |
| 10      | +                         | -                                  | <i>S. aureus</i>         | <i>S. aureus</i>               |
| 11      | +                         | -                                  | <i>S. aureus</i>         | <i>S. aureus</i>               |
| 12      | +                         | -                                  | <i>S. aureus</i>         | <i>S. aureus</i>               |
| 13      | +                         | -                                  | <i>S. aureus</i>         | <i>S. aureus</i>               |
| 14      | +                         | -                                  | <i>S. aureus</i>         | <i>S. aureus</i>               |
| 15      | +                         | -                                  | <i>S. aureus</i>         | <i>S. aureus</i>               |
| 16      | +                         | -                                  | <i>S. aureus</i>         | <i>S. aureus</i>               |

Além do mPCR ter apresentado maior poder discriminatório, é importante destacar que o tempo necessário para identificação das espécies de ECP pode ser de até 72h menor que o tempo requerido pelos testes bioquímicos, haja vista que, para identificação em nível de espécie, os testes bioquímicos necessitam de até 120h, enquanto que o mPCR requer em torno de 48h. Esse tempo de 48h ocorre em função da necessidade do crescimento bacteriano e posterior extração e amplificação de DNA, que foi a estratégia utilizada neste estudo. Entretanto, esse tempo pode ser diminuído se o DNA for extraído diretamente do alimento.

## 5 CONCLUSÕES

- I. A mPCR proposta neste estudo, utilizando-se seqüências do gene *nuc* como alvo, possibilita uma rápida e específica identificação e diferenciação entre *S. aureus*, *S. hyicus* e *S. intermedius*;
- II. A mPCR diminui em 24h o tempo de análise requerido para detecção de Estafilococos Coagulase Positiva (ECP), e em até 72h para identificação de espécie, quando comparada a técnicas bioquímicas tradicionalmente utilizadas;
- III. O IAC foi específico para o gênero Estafilococos;
- IV. A mPCR apresentou maior poder discriminatório que os testes bioquímicos para identificação de *S. aureus*, *S. hyicus* e *S. intermedius*.

## 6 REFERENCIAS

AARESTRUP, F. M., WEGENER, H. C., ROSDAHL, V. T. Evaluation of phenotypic and genotypic methods for epidemiological typing of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis in Denmark. **Veterinary Microbiology**, v.45, p.139-150, 1995.

ADESIYUN, A. A., TATINI, S. R., HOOVER, D.G. Production of enterotoxin(s) by *Staphylococcus hyicus*. **Veterinary Microbiology**, v.9, p.487-495, 1984.

ANDRESEN, L. O., AHRENS, P. A multiplex PCR for detection of genes encoding exfoliative toxins from *Staphylococcus hyicus*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 96, p. 1265 – 1270, 2004.

ARBUTHNOTT, J. P., COLEMAN, D. C., AZAVEDO, J. S. Staphylococcal toxins in human disease. **Journal of Applied Microbiology**, v.19, p.101-107, 1990.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). *Staphylococcus aureus* in foods. In: HELRICH, K. **Official methods of analysis**, 15 Ed. Arlington: AOAC, 1990.

BAIRD-PARKER, A. C. The basis for the classification of staphylococci and micrococci. **Ann. N. Y. Acad. Sci**, v.236, p.7-14. 1974.

BALABAN, N., RASOOLY, A. Staphylococcal enterotoxins. **International Journal of Food Microbiology**, v.61, p.1-10, 2000.

BANDEIRA, F. S. **Morfologia e comportamento bioquímico de cepas de *Staphylococcus aureus*, *S. intermedius* e *S. hyicus* isoladas em vacas leiteiras**. 2001. 46f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) - Faculdade de Agronomia "Eliseu Maciel", Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

BARON, F., COCHET, M. O., PELLERIN, J.L., ZAKOUR, N. B., LEBON, A., NAVARRO, A., PROUDY, I., LE LOIR, Y., GAUTIER, M. Development of a PCR test to differentiate between *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus intermedius*. **Journal of Food Protection**, v.67, p.2302–2305, 2004.

BARSKI, P., PIECHOWICZ, L., GALINSKI, J., KUR, J. Rapid assay for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using multiplex PCR. **Molecular and Cellular Probes**, v.10 p.471–475, 1996.

BHATIA, A., ZAHOOR, S. *Staphylococcus aureus* enterotoxins. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, p. 188 – 197, 2007.



BECKER, K., VON EIFF, C., KELLER, B., BRÜCK, M., ETIENNE, J., PETERS, G. Thermonuclease gene as a target for specific identification of *Staphylococcus intermedius* isolates: Use of a PCR-DNA enzyme immunoassay. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.51, p.237-244, 2005.

BOER, E., BEUMER, R. R. Methodology for detection and typing of foodborne microorganisms. **International Journal of Food Microbiology**, v.50, p.119-130, 1999.

BRAKSTAD, O. G., AASBAKK, K., MAELAND, J. A. Detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction amplification of the *nuc* gene. **Journal of Clinical Microbiology**, v.30, p.1654–1660, 1992.

BRASIL. Portaria n° 451, de 19 de setembro de 1997. Regulamento técnico. Princípios gerais para o abastecimento de critérios e padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasil, n° 182, p. 21005-21011, 22 set. 1997, seção I.

BRASIL. Resolução-RDC n° 12, de 02 de Janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasil, n° 7-E, p. 46-53, 10 Jan. 2001, seção I.

BRITO, M. A. V. P., CAMPOS, G. M. M., BRITO, J. R. F. Esquema simplificado para identificação de Estafilococos coagulase-positivos isolados de mastite bovina. **Ciência Rural**, v.32, n.1, p.79-82, 2002.

BUSH, U, NITSCHKO, H. Methods for differentiation of microorganisms. **Journal Chromatography**, v.722, p.263-278, 1999.

CAPURRO, A., CONCHA, C., NILSSON, L., ÖSTENSSON, K. Identification of coagulase-positive Staphylococci isolated from bovine milk. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.40, p.315-321, 1999.

CHAFFER, M., LEITNER, G., WINKLER, M. Coagulase-negative Staphylococci and mammary gland infectious in cows. **Journal of Veterinary Medicine B**, v.46, p.707-712, 1999.

CHIANG, Y. C., LIAO, W. W., FAN, C. M., PAI, W. Y., CHIOU, C. S., TSEN, H. Y. PCR detection of Staphylococcal enterotoxins (SEs) N, O, P, Q, R, U and survey of SE types in *Staphylococcus aureus* isolates from food-poisoning cases in Taiwan. **International Journal of Food Microbiology**, v. 121, p. 66–73, 2008.

COELHO, S. M. O., MORAES, R. A. M., SOARES, L. C., PEREIRA, I. A., GOMES, L. P., SOUZA, M. M. S. Mapeamento do perfil de resistência e detecção do gene *mecA* em *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus intermedius* oxacilina-resistentes isolados de espécies humanas e animais. **Ciência rural**, 2007.

CREMONESI, P., LUZZANA, M., BRASCA, M., MORANDI, S., LODIB, R., VIMERCATI, C., AGNELLINI, D., CARAMENTI, G., MORONI, P., CASTIGLIONI, B. Development of a multiplex PCR assay for the identification of *Staphylococcus aureus* enterotoxigenic strains isolated from milk and dairy products. **Molecular and Cellular Probes**, v. 19, p. 299 – 305, 2005.

DEVRIESE, L. A., HAJEK, V., OEDING, P., MEYER, S. A., SCHLEIFER, K. H. *Staphylococcus hyicus*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.28, p.482-490, 1978.

DOWNES, F. P., ITO, H. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**, 4. ed. Washington: American Public Health Association (APHA), 2001. 676p.

EUZÉBY, J. P. **List of Bacterial names with Standing in Nomenclature**, Disponível em: <<http://www.bacterio.cict.fr/s/staphylococcus.html>>. Acesso em: 25 abr. 2008.

FARBER, J. M., GENDEL, S. M., TYLER, K. D., BOERLIN, P., LANDRY, W. L., FRITSCHER, S. J., BARRETT, T. J. Molecular typing and differentiation. In: DOWNES, F. P., ITO, H. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**, 4. ed. Washington: American Public Health Association (APHA), 2001. Chap. 11, p.127-158.

FRANCO, B. D. G. M., LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. 2 ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2002. 184p.

FREIRAS, M. F. L., BALBINO, T. C. L., MOTA, R. A., STAMFORD, T. L. M. Exotoxinas estafilocócicas. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, v. 7, n. 2 e 3, p. 63 – 74, 2004.

FRENEY, J., BRUN, Y., BES, M. *Staphylococcus lugdunensis* sp. nov. and *Staphylococcus schleiferi* sp. nov., two species from human clinical specimens. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.38, p.168-172, 1988.

GANDRA, E. A. **Identificação de *Staphylococcus aureus*, *S. hyicus* e *S. intermedius* através de testes bioquímicos e da amplificação por PCR de sequências dos genes *coa* e *nuc***. 2003. 101f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) - Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

GANDRA, E. A., SILVA, J. A., MACEDO, M. R. P., ARAÚJO, M. R., MATA, M. M., SILVA, W. P. Biochemical differentiation among *S. aureus*, *S. Intermedius* and *S. hyicus* isolated from bovines with subclinical mastitis. **Archives of Veterinary Science**. v.10, n.1, p. 75 - 81, 2005.

- GANDRA, E. A. **Multiplex PCR para detecção de *Staphylococcus aureus*, *S. intermedius* e *S. hyicus* em leite UHT artificialmente contaminado.** 2006. 69f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) - Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.
- HÁJEK, V. *Staphylococcus intermedius*, a new species isolated from animals. **International Journal of Systematic Bacteriology**. v.26, p.401-408, 1976.
- HOLECKOVÁ, B., HOLODA, E., FOTTA, M. Occurrence of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in food. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**. v. 9, p. 179-182, 2002.
- HOORFAR, J., MALORNY B., ABDULMAWJOOD, A., COOK, N., WAGNER, M., FACH, P. Practical considerations in design of internal amplification controls for diagnostic PCR assays. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, n. 5, p. 1863 – 1868, 2004.
- HOOVER, D. G., TATINI, S. R., MALTAIS, J. B. Characterization of staphylococci. **Applied Environmental Microbiology**. v.46, p.649-660, 1983.
- HUSSAIN, M., EIFF, C., SINHA, B., JOOST, I., HERRMANN, M., PETERS, G., BECKER, K. *eap* gene as novel target for specific identification of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 46, n. 2, p. 470 – 476, 2008.
- HWANG, S. Y., KIM, S. H., JANG, E. J., KWON, N. H., PARK, Y. K., KOO, H. C., JUNG, W. K., KIM, J. M., PARK, Y. H. Novel multiplex PCR for the detection of the *Staphylococcus aureus* superantigen and its application to raw meat isolates in Korea. **International Journal of Food Microbiology**. v. 117, p. 99 – 105, 2007
- IKEDA T., TAMATE N., YAMAGUCHI K., MAKINO S. I. Mass outbreak of food poisoning disease caused by small amounts of Staphylococcal enterotoxins A and H. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 71, n. 5, p. 2793–2795, 2005.
- INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS (ICMSF). Leche y productos lácteos. In: **Ecología Microbiana de los alimentos: productos alimenticios**. Zaragoza: Editorial Acribia S.A., 1985. Cap. 18, p.472-525.
- JAY, J. M. **Modern Food Microbiology**. Fifth Edition. London: Chapman & Hall, 2005, 661 p.
- JØRGENSEN H. J., MATHISEN T., LØVSETH A., OMOE K., QVALE K. S., LONCAREVIC S. An outbreak of staphylococcal food poisoning caused by enterotoxin H in mashed potato made with raw milk. **FEMS Microbiology Letters**. p. 267 – 272, 2005.
- KALOREY, D. R., SHANMUGAM, Y., KURKURE, N. V., CHOUSALKAR, K. K., BARBUDDHE, S. B. PCR-based detection of genes encoding virulence determinants in *Staphylococcus aureus* from bovine subclinical mastitis cases. **Journal Veterinary Science**. v. 8, n. 2, p. 151 – 154, 2007.

KHAMBATY, F. M., BENNETT, R. W., SHAH, D. B. Pulsed-field gel electrophoresis to the epidemiological characterisation of *Staphylococcus intermedius* implicated in a food-related outbreak. **Epidemiology Infection**. v.113, p.75–81, 1994.

KLERKS, M. M., ZIJLSTRA, C., van BRUGGEN, A. H. Comparison of real-time PCR methods for detection of *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157:H7, and introduction of a general internal amplification control. **Journal of Microbiological Methods**. v. 59, p. 337 – 349. 2004.

KLOOS, W. E., BANNERMAN, T. L. *Staphylococcus* and *Micrococcus*. In: MURRAY, P. R., BARON, E. J., PFALLER, M. A., TENOVER, F. C., YOLKEN, R. H. **Manual of Clinical Microbiology**. 7 Ed. Washington: American Society for Microbiology, 1999. Chap.16, p.264-282.

KONEMAN, E. W., ALLEN, S. D., JANDA, W. M., SCHRECKENBERGER, P. C., WINN JR., W. C. **Diagnóstico Microbiológico**. São Paulo: Medsi Editora Médica e Científica Ltda., 2001. 1466p.

LANCETTE, G. A., TATINI, S. R. *Staphylococcus aureus*. In: VANDERZANT, C., SPLITTSTOESSER, D. F. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 3 Ed. Washington: American Public Health Association, p. 533 – 550, 1992.

LEVY, C. E. Aspectos Microbiológicos. In: RODRIGUES, E. A. C., MENDONÇA, J. S., AMARANTE, J. M. B., FILHO, M. B. A., GRINBAUM, R. S., RICHTMANN, R. **Infecções hospitalares: prevenção e controle**. São Paulo: Sarvier, 1997. p.591-598.

LINA G., GILLET Y., VANDENESCH F., JONES M. E., FLORET D., ETIENNE J. Toxin involvement in staphylococcal scalded skin syndrome. **Clinical Infectious Disease**. V. 25, n. 6, p. 1369 – 1373, 1997.

MAES, N., MAGDALENA, J., ROTTIERS, S., DE GHELDRE, Y., STRUELENS, M. J. Evaluation of a triplex PCR assay to discriminate *Staphylococcus aureus* from coagulase-negative Staphylococci and determine methicillin resistance from blood cultures. **Journal of Clinical Microbiology**. v.40, n.4, p.1514–1517, 2002.

MALORNY, B., TASSIOS, P. T., RADSTRÖM, P., COOK, N., WAGNER, M., HOORFAR, J. Standardization of diagnostic PCR for the detection of foodborne pathogens. **International Journal of Food Microbiology**, 2002.

MARTÍN B., GARRIGA M., HUGAS M., BOVER-CID S., VECIANA-NOGUE'S M. T., AYMERICH T. Molecular, technological and safety characterization of Gram-positive catalase-positive cocci from slightly fermented sausages. **International Journal of Food Microbiology**. v. 107, p. 148 – 158, 2006.

MATTHEWS, K. R., ROBERSON, J., GILLESPIE, B. E., LUTHER, D. A., OLIVER, S. P. Identification and differentiation of coagulase-negative *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction. **Journal of Food Protection**. v.60, n.6, p. 686-688, 1997.

MORANDI S., BRASCA M., LODI A R., CREMONESI P., CASTIGLIONI B. Detection of classical enterotoxins and identification of enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* from milk and dairy products. **Veterinary Microbiology**. v. 124, p. 66–72, 2007.

MURRAY, P. R., BARON, E. J., PFALLER, M. A., TENOVER, F. C., YOLKEN, R. H. **Manual of Clinical Microbiology**. 7 Ed. Washington: American Society for Microbiology. 1999. 1420p.

NEVES, M.C.; ROSSI JÚNIOR, O.D.; ALVES, E.C.C.; LEMOS, M.V.F. Detecção de genes de resistência antimicrobiana em cromossomos e plasmídeos de *Staphylococcus* spp. **Revista Arquivos do Instituto Biológico**. v. 74, n. 3, p. 207 – 213, 2007.

NORMANNO, G., FIRINU, A., VIRGILIO, S., MULA, G., DAMBROSIO, A., POGGIU, A., DECASTELLI, L., MIONI, R., SCUOTA, S., BOLZONI, G., DI GIANNATALE, E., SALINETTI, A. P., LA SALANDRA, G., BARTOLI, M., ZUCCON, F., PIRINO, T., SIAS, S., PARISI, A., QUAGLIA, N. C., CELANO, G. V. Coagulase-positive Staphylococci and *Staphylococcus aureus* in food products marketed in Italy. **International Journal of Food Microbiology**. v. 98, p. 73 – 79, 2005.

NOVAK, F. R. **Ocorrência de *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina em leite humano ordenhado**. 1999. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

OLIVEIRA, S. J. **Microbiologia veterinária. Guia Bacteriológico Prático** 2 ed. Canoas: Editora da Ulbra, 2000. 240p.

ORWIN, P. M., FITZGERALD, R., LEUNG, D. Y. M., GUTIERREZ, J. A., BOHACH, G. A., SCHLIEVERT, P. M. Characterization of *Staphylococcus aureus* Enterotoxin L. **Infection Immunology**. v. 71, n.5, p.2916–2919, 2003.

ROBERSON, J. R., FOX, L. K., HANCOCK, D. D., BESSER, T. E. Evaluation of methods for differentiation of coagulase-positive Staphylococci. **Journal of Clinical Microbiology**. v.30, p.3217-3219, 1992.

SÁNCHEZ, G. N., RODRÍGUEZ, R. M., OLVERA, P. R., GARZA, L. M. Development of two multiplex polymerase chain reactions for the detection of enterotoxigenic strains of *Staphylococcus aureus* isolated from foods. **Journal of Food Protection** v.66, p.1055–1062, 2003.

SASAKI, T., KIKUCHI, K., TANAKA, Y., TAKAHASHI, N., KAMATA, S., HIRAMATSU, K. Reclassification of phenotypically identified *Staphylococcus intermedius* strains. **Journal of Clinical Microbiology**. V. 45, n.9, p. 2770 – 2778, 2007.

SNEATH, P. H. A., MAIR, N. S., SHARPE, M. E. Gram positive cocci. In: **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9 Ed. Baltimore: The Willians & Wilkins Co, 1986. v.2, p.999-1103.

STAMFORD, T. L. M., SILVA, C. G. M., MOTA, R. A., CUNHA NETO, A. Enterotoxigenicidade de *Staphylococcus spp.* isolados de leite in natura. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. V. 26, p. 41 – 45, 2006.

SAMBROOK, J. AND RUSSELL, D. W. **Molecular cloning: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.** 2001.

SILVA, W. P. **Caracterização fenotípica e genotípica de cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas de leite de vacas com mastite subclínica e de outras fontes em propriedades produtoras de leite.** 1998. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Pulo. .

SILVA, N., JUNQUEIRA, V. C. A., SILVEIRA, N. F. A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**, São Paulo: Livraria Varela, 2001. 317p.

SILVA, W. P., SILVA, J. A., MACEDO, M. R. P., ARAÚJO, M. R., MATA, M. M., GANDRA, E. A. Identification of *Staphylococcus aureus*, *S. intermedius*, and *S. hyicus* by PCR amplification of *coa* and *nuc* genes. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.34, p.125-127, 2003.

SIQUEIRA, R. S. **Manual de microbiologia dos alimentos**. Brasília: Embrapa, 1995.

STROMMINGER, B., KETTLITZ, C., WERNER, G., WITTE W. Multiplex PCR assay for simultaneous detection of nine clinically relevant antibiotic resistance genes in *Staphylococcus aureus*. **Journal Of Clinical Microbiology**. v. 41, n. 9, p. 4089–4094, 2003.

TAMARAPU, S., MCKILLIP, J. L., DRAKE, M. Development of a multiplex polymerase chain reaction assay for detection and differentiation of *Staphylococcus aureus* in dairy products. **Journal of Food Protection**. v.64, n.5, p.664-668, 2001.

VALLE, J., GOMEZ-LUCIA, E., PIRIZ, S., GOYACHE, J., ORDEN, J. A., VADILLO, S. Enterotoxin production by staphylococci isolated from healthy goats. **Applied Environmental Microbiology**. v.56, p.1323-1326, 1990.

VARALDO, P. E., KILPPER-BALZ, R., BIAVASCO, F. *Staphylococcus delphini* sp. nov., a coagulase positive species isolated from dolphins. **International Journal of Systematic Bacteriology**. v.38, p.436-439, 1988.

VOYTENKO, A. V., KANBAR, T., ALBER, J., LA"MMER, C.,\*, WEISS, R., PRENGER-BERNINGHOFF, E., ZSCHO"CK, M., AKINEDEN, O., HASSAN, A. A., DMITRENKO, O. A. Identification of *Staphylococcus hyicus* by polymerase chain reaction mediated amplification of species specific sequences of superoxide dismutase A encoding gene *sodA*. **Veterinary Microbiology**. v. 116, p. 211 – 216, 2006.

WAKITA, Y., KAWANO, J., SHIMIZU, A., HÁJEK, V., TOMISAKA, E., YASUDA, R., MATSUO, E. Development of a PCR test for the identification of *Staphylococcus intermedius* based on 16S rDNA sequence. **Journal of Veterinary Medical Science**. v.64, n.7, p.603-605, 2002.

WANDENESH, F., CÉLARD, M., ARPIN, D., BES, M., GREENLAND, T., ETIENNE, J. Catheter-related bacteremia associated with coagulase-positive *Staphylococcus intermedius*. **Journal of Clinical Microbiology**. v.33, n.9, p.2508-2510, 1995.

WATTS, J. L., OWENS, W. E. Prevalence of staphylococcal species in four dairy herds. **Research in Veterinary Science**, v.46, p.1-4, 1989.

YANG, Y., SU, X., YUAN, Y., KANG, C., LI, Y., ZHANG, W., ZHONG, X. Detection of *Staphylococcus aureus* in dairy products by polymerase chain reaction assay. **Agricultural Sciences in China**. v. 6, n. 7, p. 857 – 862, 2007.

ZAHA, A., FERREIRA, H. B., PASSAGLIA, L. M. P. **Biologia molecular básica**. 3<sup>a</sup> ed. Porto Alegre: Mercado Aberto, 424p. 2003.

ZHANG, K., SPARLING, J., CHOW, B. L., ELSAYED, S., HUSSAIN, Z., CHURCH, D. L., GREGSON, D. B., LOUIE, T., CONLY J. M. New Quadriplex PCR Assay for Detection of Methicillin and Mupirocin Resistance and Simultaneous Discrimination of *Staphylococcus aureus* from Coagulase-Negative Staphylococci. **Journal Of Clinical Microbiology**. v. 42, n. 11, p. 4947–4955, 2004.