

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AGROINDUSTRIAL



Tese

Staphylococcus aureus ENTEROTOXIGÊNICOS:
PCR PARA DETECÇÃO EM QUEIJO MINAS FRESCAL E
CARACTERIZAÇÃO DO AGRUPAMENTO *egc* EM ISOLADOS OBTIDOS
EM ALIMENTOS DE ORIGEM ANIMAL

Fernando Zocche

Pelotas, 2008

FERNANDO ZOCHE

Staphylococcus aureus ENTEROTOXIGÊNICOS:
PCR PARA DETECÇÃO EM QUEIJO MINAS FRESCAL E
CARACTERIZAÇÃO DO AGRUPAMENTO *egc* EM ISOLADOS OBTIDOS
EM ALIMENTOS DE ORIGEM ANIMAL

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientador: Professor Doutor Wladimir Padilha da Silva

Pelotas, 2008

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Celso Medina Fagundes

Prof. Dr. Fábio Pereira Leivas Leite

Prof. Dr. Fabricio Rochedo Conceição

Prof. Dr. Wladimir Padilha da Silva (Orientador)

AGRADECIMENTOS

À Deus.

Aos meus pais, Reinaldo e Maria Sofia, e aos meus irmãos Adriano e Larissa por todo o incentivo, apoio e carinho.

À RENATA, o grande amor da minha vida.

Ao Professor e amigo Wladimir Padilha da Silva, pela orientação, confiança, amizade e inestimáveis horas de descontração durante o curso e execução do trabalho, o qual não poupou dedicação ao meu amadurecimento e formação profissional.

À Universidade Federal de Pelotas/FAEM/DCTA pela oportunidade de realizar o curso de Pós-Graduação.

Ao BIOTECNAL/DCTA/FAEM, pela infra-estrutura disponibilizada.

Ao Centro de Biotecnologia da UFPel, pelo apoio material e orientação durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento do projeto.

À Coordenação de Apoio ao Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

Aos amigos (as) Andréia, Caroline, Celso, Cláudio, Denise, Élen, Fábio Padilha, Karla, Marcelo, Kátia, Lauri, Márcia Araújo, Márcia Jantzen, Milena, Júlia, Rodrigo e Valmor, pelo apoio, carinho, incentivo e auxílio quando solicitados.

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

RESUMO

ZOCCHÉ, Fernando. ***Staphylococcus aureus* enterotoxigênicos: PCR para detecção em queijo Minas Frescal e caracterização do agrupamento *egc* em isolados obtidos em alimentos de origem animal.** 2008. 102f. Tese (Doutorado). Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Staphylococcus aureus é, entre as bactérias do gênero, a espécie mais relacionada a casos e/ou surtos de intoxicação alimentar, devido à capacidade de produzir até 22 diferentes enterotoxinas (EE). O microrganismo pode ser encontrado facilmente em alimentos de origem animal, principalmente leite e derivados, razão pela qual estes alimentos estão intimamente relacionados com os casos e surtos da doença. A detecção tradicional de *S. aureus* em alimentos é laboriosa, exige o uso de vários meios de cultura, além de equipamentos e mão de obra especializada. A introdução da PCR (reação em cadeia da polimerase) em diagnóstico microbiano veio potencializar métodos de análise baseados em seqüências de ácidos nucleicos, estabelecendo uma alternativa viável aos métodos tradicionais de cultura e testes imunológicos utilizados para a detecção e caracterização de *S. aureus* enterotoxigênicos. Dessa forma, este trabalho teve como objetivos padronizar uma técnica para extração de DNA de *S. aureus* enterotoxigênicos diretamente de queijo Minas Frescal artificialmente contaminado; amplificar, por PCR, os genes *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *sei*, *selj*, *selm* e *selo*, tendo como molde o DNA de *S. aureus* extraído diretamente de queijo Minas Frescal artificialmente contaminado; e, detectar, por PCR, os genes do agrupamento *egc* (*seg*, *sei*, *selm*, *seln* e *selo*), tendo como molde o DNA de *S. aureus* isolados de diferentes produtos de origem animal. Para a padronização da extração do DNA de *S. aureus* em queijo Minas Frescal artificialmente contaminado, foram adaptados dois métodos já descritos na literatura, os quais foram denominados métodos A e B. O método A foi baseado na remoção de componentes da matriz alimentar, tais como gordura e proteínas, através de solventes orgânicos, enquanto o método B, baseou-se na utilização de centrifugação e proteinase K para remoção da gordura e proteínas, respectivamente. Após extração do DNA pelos dois métodos, realizou-se PCR para amplificar fragmentos de genes de EE. Com o DNA obtido pelo método A, foi possível amplificar fragmentos dos genes *sea*, codificador da enterotoxina estafilocócica A (EEA), *seb* (EEB), *sec* (EEC), *sed* (EED), *see* (EEE), *sei* (EEI) e *selj* (EELJ), quando *S. aureus* encontrava-se numa concentração $\geq 10^6$ UFC.g⁻¹ de queijo. Já com o DNA obtido a partir do método B foi possível amplificar fragmentos dos genes *sea* (EEA), *sed* (EED), *sei* (EEI) e *selj* (EELJ) em concentrações de até 10² UFC.g⁻¹ de queijo e dos genes *seb* (EEB), *sec* (EEC), *see* (EEE) e *seg* (EEG) em concentrações $\geq 10^3$ UFC.g⁻¹. *S. aureus* produz EE suficiente para causar intoxicação alimentar estafilocócica somente quando atinge concentração celular de, aproximadamente, 10⁵ UFC.g⁻¹ de alimento, ou seja, com o DNA obtido pelo método B foi possível detectar *S. aureus* enterotoxigênicos em queijo Minas Frescal artificialmente contaminado antes desse microrganismo alcançar níveis potencialmente perigosos para a saúde humana. O método B foi mais eficiente que o método A, possibilitando amplificação de genes de

EE em concentrações de *S. aureus* de até 10^2 UFC.g⁻¹ de queijo. Após a padronização, o método B foi utilizado para extração de DNA de *S. aureus* em queijo Minas Frescal artificialmente contaminado, objetivando-se detectar, por PCR, dez genes de EE com sensibilidade adequada para avaliar a conformidade do produto em relação a legislação brasileira. Desenvolveu-se, então, PCR específica para amplificação dos genes *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *sei*, *selj*, *selm* e *selo*, as quais apresentaram sensibilidade $\geq 10^2$ UFC de *S. aureus* por grama de queijo. Com a extração de DNA e a PCR proposta neste estudo é possível detectar *S. aureus* enterotoxigênico em queijo Minas Frescal artificialmente contaminado antes desse microrganismo alcançar níveis capazes de causar a doença, além de permitir verificar se o produto atende aos parâmetros microbiológicos legais para esse microrganismo. Visando-se avaliar a presença de genes pertencentes ao agrupamento *egc* (*seg*, *sei*, *selm*, *seln* e *selo*) em *S. aureus* isolados em diferentes alimentos de origem animal e relacionar sua presença com a origem das cepas, extraíram-se o DNA de 41 cepas de *S. aureus*, sendo 14 oriundas de carcaça de frango, 14 de leite cru, 8 de embutidos cárneos e 5 de queijo. Após, realizou-se PCR para amplificação de um fragmento do agrupamento *egc*, de 3375pb e amplificaram-se, individualmente, fragmentos dos genes pertencentes ao agrupamento. O perfil enterotoxigênico das cepas de *S. aureus* variou de acordo com a sua origem, sendo elevada a prevalência de cepas isoladas em carcaças de frangos que possuíam todos os genes do agrupamento e reduzida naquelas oriundas dos demais alimentos. Há presença de genes do agrupamento *egc* em cepas de *S. aureus* isoladas em alimentos de origem animal, entretanto, diferentes genótipos puderam ser observados em função da fonte de isolamento. Em cepas isoladas de frangos a presença do agrupamento *egc* completo é elevada.

Palavras-chave: enterotoxinas estafilocócicas, queijo minas frescal, alimentos de origem animal, detecção, PCR, *cluster egc*.

ABSTRACT

ZOCHE, Fernando. ***Staphylococcus aureus* enterotoxigênicos: PCR para detecção em queijo Minas Frescal e caracterização do agrupamento egc em isolados obtidos em alimentos de origem animal.** 2008. 102f. Tese (Doutorado). Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Staphylococcus aureus is among the bacteria of the genus, species more related to cases and/or outbreaks of food poisoning due to the capacity to produce up to 22 different enterotoxins (EE). The microorganism can be easily found in foods of animal origin, mainly milk and derivatives, which is why these foods are closely related to the cases and outbreaks of disease. The traditional detection of the *S. aureus* in food is laborious, requires the use of various means of cultivation, in addition to equipment and use of specialized workforce. The introduction of the PCR (polymerase chain reaction) in the diagnosis came enhance microbiological methods of analysis based on sequences of nucleic acids, establishing a viable alternative to traditional methods of cultivation and immunology tests used for the detection and characterization of enterotoxigenics *S. aureus*. Thus, this study aimed to standardize a technique for to extract DNA from enterotoxigenic *S. aureus* directly from artificially contaminated Minas Frescal cheese; amplify, by PCR, the *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *sei*, *selj*, *selm* and *selo* staphylococcal enterotoxins genes, with *S. aureus* DNA extracted directly from artificially contaminated Minas Frescal cheese; and detect, by PCR, the genes of the *egc* cluster (*seg*, *sei*, *selm*, *seln* and *selo*), with the *S. aureus* DNA isolated from various animal products. In order, it has adapted two methods described in the literature for DNA extraction from *S. aureus* in Minas Frescal cheese, called them of method A and method B. The method A is based on the removal of matrix components of the food, as well as lipids and proteins through organics solvents, whereas the method B is based on using of centrifugation and proteinase K for removal of lipids and protein, respectively. After the DNA extraction by the two methods, PCR was achieved to amplify fragments of the staphylococcal enterotoxins genes. With the DNA obtained by method A was possible to amplify fragments of the *sea* gene, staphylococcal enterotoxin A encoder (SEA), *seb* (SEB), *sec* (SEC), *sed* (SED), *see* (SEE), *sei* (SEI) and *selj* (SEIJ), when *S. aureus* was in a concentration $\geq 10^6$ CFU.g⁻¹ of cheese. On the other hand, with the DNA obtained by method B was possible to amplify fragments of *sea* gene (SEA), *sed* (SED), *sei* (SEI) and *selj* (SEIJ) in concentration up to 10^2 UFC.g⁻¹ of cheese and *seb* gene (SEB), *sec* (SEC), *see* (SEE) and *seg* (SEG) in concentration $\geq 10^3$ CFU.g⁻¹. *S. aureus* produces EE enough to causing staphylococcal food poisoning only when it reaches cell concentration of approximately 10^5 CFU.g⁻¹ of food, that is with the DNA obtained by method B has been possible to detect enterotoxigenic *S. aureus* in artificially contaminated Minas Frescal cheese before this microorganism reaches levels potentially dangerous for the human health. The method B was more efficient than the method A, enabling amplification of the EE genes in concentration of *S. aureus* up to 10^2 CFU.g⁻¹ of cheese. After the standardization, the method B was used to extract DNA from *S. aureus* directly of artificially contaminated Minas Frescal cheese, aiming to detect, by PCR, ten genes of EE with appropriate sensitivity to evaluate the compliance of the product in relation to Brazilian legislation. The PCR reactions were specific to *sea*,

seb, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *sei*, *selj*, *selm* and *selo* genes showing sensitivity $\geq 10^2$ CFU of *S. aureus* per gram of cheese. With the DNA extraction and PCR purposed in this study it is possible to detect enterotoxigenic *S. aureus* in artificially contaminated Minas Frescal cheese before this microorganism reach levels capable to cause the illness, beside to allow verify if the product fill in the legal microbiological parameters for this microorganism. In the other hand, to evaluate the presence of genes belonging to the egc cluster (*seg*, *sei*, *selm*, *seln* and *selo*) in *S. aureus* from different foods of animal origin and relate their presence on the origin of the strains, it is extracted the DNA of 41 of *S. aureus* strains, being 14 from chicken carcasses, 14 of raw milk, 8 of sausages and 5 of cheese. We made for PCR amplification a fragment (3375pb) of the egc cluster, and fragments of genes belonging to the cluster was amplified individually. The enterotoxigenic profile of *S. aureus* strains varied according to their origin, and was high the prevalence of strains isolated from chickens carcasses that had all the genes in the cluster. The strains from the other food, the prevalence of cluster was reduced. There presence of genes in the egc cluster in *S. aureus* strains isolated from foods of animal origin, however, different genotypes were observed depending on the source of isolation. In strains isolated from chickens, the presence of the complete egc cluster is high.

Keywords: staphylococcal enterotoxins, Minas Frescal cheese, foods of animal origin, detection, PCR, egc cluster.

SUMÁRIO

1 Introdução	11
2 Objetivos	13
3 Revisão de literatura	14
3.1 <i>Staphylococcus</i> spp. e <i>Staphylococcus aureus</i>	14
3.2 Enterotoxinas Estafilocócicas	16
3.3 Intoxicação Alimentar Estafilocócica.....	26
3.4 Queijo Minas Frescal	32
4 ARTIGO 1: Comparação entre Dois Métodos para Extração de DNA de <i>Staphylococcus aureus</i> em Queijo Minas Frescal.....	34
RESUMO	35
SUMMARY	36
1. INTRODUÇÃO.....	37
2. MATERIAL E MÉTODOS	38
2.1 Cepas bacterianas	38
2.2 Contaminação artificial do queijo Minas Frescal	39
2.3 Extração do DNA.....	39
2.4 Oligonucleotídeos iniciadores	41
2.5 Reação em cadeia da polimerase	41
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
4. CONCLUSÃO	46
5. AGRADECIMENTOS.....	47
6. REFERÊNCIAS	47
5 ARTIGO 2: PCR para Detecção de <i>Staphylococcus aureus</i> Enterotoxigênicos em Queijo Minas Frescal.....	50
RESUMO	51
SUMMARY	52
1. INTRODUÇÃO.....	52
2. MATERIAL E MÉTODOS	54
2.1 Cepas bacterianas	54
2.2 Contaminação artificial do queijo Minas Frescal	55
2.3 Extração do DNA.....	55
2.4 Oligonucleotídeos iniciadores	56
2.5 Reação em cadeia da polimerase	56
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
4. CONCLUSÃO	61
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61
6. AGRADECIMENTOS.....	66
6 ARTIGO 3: Detecção de Genes do Agrupamento <i>egc</i> em <i>Staphylococcus aureus</i> Isolados de Alimentos de Origem Animal.....	67
RESUMO	68

SUMMARY	69
1. INTRODUÇÃO.....	69
2. MATERIAL E MÉTODOS	70
2.1. Extração de DNA.....	71
2.2. Oligonucleotídeos iniciadores e condições de PCR	71
2.3. Amplificação parcial do agrupamento <i>egc</i>	72
2.4. Análise de restrição do agrupamento <i>egc</i> parcial (3375pb)	73
2.5 Amplificação dos genes <i>seg</i> , <i>sei</i> , <i>selm</i> , <i>seln</i> e <i>selo</i>	73
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	73
4. CONCLUSÕES.....	77
5. REFERÊNCIAS	77
6. AGRADECIMENTOS.....	82
7 Referências	83
APÊNDICE 1: Fotos mostrando o DNA extraído com o método A, durante a padronização do protocolo descrito no artigo 1, pág.39.....	97
APÊNDICE 2: Fotos mostrando o DNA extraído com o método B, durante a padronização do protocolo descrito no artigo 1, pág. 40.....	99
APÊNDICE 3: Fotos mostrando amplificações de fragmentos dos genes do agrupamento <i>egc</i> em <i>S. aureus</i> isolados em alimentos de origem animal	101

1 Introdução

O gênero *Staphylococcus* é formado, atualmente, por 41 espécies. Destas, *Staphylococcus aureus* é a mais relacionada a casos e a surtos de intoxicação alimentar devido à capacidade de grande parte de suas cepas produzirem enterotoxinas (EE). Na literatura são descritos inúmeros surtos de intoxicação alimentar causados pela ingestão de alimentos contendo EE pré-formadas. Em função do risco à saúde pública que a presença de *S. aureus* representa em alimentos, estabeleceu-se, em diversos países, a obrigatoriedade de sua pesquisa e enumeração, como parte das ações de fiscalização sanitária de órgãos governamentais.

S. aureus pode produzir até 22 enterotoxinas, sendo considerado, por esse motivo, um potencial agente biológico capaz de causar enfermidades alimentares em humanos. Além disso, as EE podem ser produzidas em grandes quantidades e são relativamente estáveis à inativação física e química, sendo que uma pequena quantidade ($<1\mu\text{g}$) já é suficiente para causar os sintomas clínicos de intoxicação alimentar estafilocócica. Merecem destaque as EE clássicas, denominadas EEA, EEB, EEC, EED e EEE por serem responsáveis por até 95% dos casos e surtos de intoxicação alimentar, e as EE codificadas pelos genes pertencentes ao agrupamento *egc*, as quais são denominadas EEG, EEI, EEIM, EEIN e EEIO, por serem emergentes e cujo relacionamento com cepas de *S. aureus* isoladas de alimentos de origem animal e participação em casos e surtos de intoxicação alimentar tem aumentado nos últimos anos.

Alimentos de origem animal são descritos como potenciais veículos de *S. aureus* e EE. Leite e derivados lácteos são alimentos de alta aceitabilidade e consumo

e estão intimamente relacionados a surtos devido, principalmente, ao fato de *S. aureus* ser um dos principais agentes da mastite bovina. Deve-se ressaltar que, mesmo após o leite ter sido processado termicamente, é possível que o queijo produzido a partir desse leite possua EE numa quantidade suficiente para causar um surto de intoxicação alimentar. Além disso, o microrganismo pode ter fácil acesso ao alimento após o processamento devido a práticas inadequadas de manipulação e armazenamento.

Os métodos tradicionais utilizados para o diagnóstico de *S. aureus* em queijo são demorados, exigem a utilização de diversos meios de cultura, longos períodos de incubação da bactéria, além de equipamentos e mão-de-obra especializada. Além disso, estes métodos permitem apenas o isolamento e identificação do microrganismo, sendo necessários testes imunológicos adicionais para a caracterização da enterotoxigenicidade do patógeno. Nesse contexto, faz-se necessário um método de diagnóstico de *S. aureus* enterotoxigênicos que seja confiável, rápido, simples e sensível para a avaliação da segurança de queijos, especialmente o queijo Minas Frescal.

A introdução da PCR (reação em cadeia da polimerase) em diagnóstico microbiano veio potencializar métodos de análise baseados em seqüências de ácidos nucléicos, estabelecendo uma alternativa viável aos métodos tradicionais de cultura e testes imunológicos utilizados para a detecção e caracterização de *S. aureus* enterotoxigênicos. Embora esta técnica apresente algumas desvantagens, tais como equipamentos e insumos de alto custo, necessidade de mão de obra especializada e a presença de inibidores da reação oriundos de alimentos, apresenta, por outro lado, diversas vantagens em relação aos métodos convencionais, como maior poder de tipificação e discriminação, maior rapidez, bom limite de detecção, maior seletividade, especificidade e potencial para automação, para sua adequada execução, é necessário um DNA de qualidade, sem a presença de possíveis agentes que possam interferir na reação.

2 Objetivos

Padronizar uma técnica para extração de DNA de *S. aureus* enterotoxigênicos diretamente de queijo Minas Frescal.

Amplificar, por PCR, os genes *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *sei*, *selj*, *selm* e *selo*, tendo como molde o DNA de *S. aureus* extraído diretamente de queijo Minas Frescal.

Detectar, por PCR, os genes do agrupamento *egc* (*seg*, *sei*, *selm*, *seln* e *selo*), tendo como molde o DNA de *S. aureus* isolados de diferentes produtos de origem animal (carcaça de frango, embutidos cárneos, queijo tipo colônia e Minas Frescal e leite cru).

3 Revisão de literatura

3.1 *Staphylococcus* spp. e *Staphylococcus aureus*

Os microrganismos do gênero *Staphylococcus* pertencem a família *Micrococcaceae*, apresentam forma de coco e tendem a formar agrupamentos semelhantes a cachos de uva. São Gram positivos, possuindo diâmetro variando entre 0,5 e 1,5µm, imóveis e não formam esporos. Possuem metabolismo fermentativo e respiratório, neste último, vindo a produzir catalase (VARNAN e EVANS, 1991; KLOOS e BANNERMAN, 1999).

Staphylococcus spp. possui uma distribuição ubiqüitária, sendo seu reservatório primário a pele e membranas mucosas, especialmente a região naso-faríngea de mamíferos e aves (ATANASSOVA, MEINDL e RING, 2001). Atualmente, o gênero é composto por 41 espécies e 24 subespécies (EUZÉBY, 2008), sendo que algumas são freqüentemente associadas a uma ampla variedade de infecções de caráter oportunista, tanto em seres humanos como em animais (TRABULSI, TEIXEIRA e BUERIS, 2004). Dentre estas espécies, destaca-se *Staphylococcus aureus* como a mais envolvida em doenças em seres humanos (KONEMAN et al., 2001).

S. aureus são bactérias mesófilas, apresentando temperatura de crescimento na faixa de 7°C a 47,8°C, no entanto, as enterotoxinas estafilocócicas são produzidas entre 10°C e 46°C, com um ótimo entre 40°C e 45°C, sendo que os extremos de temperatura estão na dependência dos demais parâmetros que devem encontrar-se em condições ótimas. As bactérias deste gênero são tolerantes a concentrações de 10% a 20% de NaCl e a nitratos, o que torna os alimentos curados veículos potenciais para as mesmas. Em relação ao pH, *S. aureus* cresce na faixa de 4 a 9,8, com um ótimo entre 6

e 7. Em relação à atividade de água, o valor mínimo necessário para o microrganismo se desenvolver é 0,86, embora sob condições ideais, esta bactéria já tenha se desenvolvido em atividade de água de 0,83 (FRANCO e LANDGRAF, 2002).

Staphylococcus aureus é uma das três espécies de cocos Gram positivos que são patogênicas para o homem. Estima-se que 25% da população humana sejam carreadores permanentes deste microrganismo, sendo os fatores mais comuns que predispõe o hospedeiro a essa infecção, as injúrias de pele e mucosas, infecções virais, anormalidades metabólicas, como por exemplo, diabetes, e condições miscelâneas, como má nutrição e idade avançada. Uma vez instalado em seu hospedeiro, pode causar uma enorme variedade de sintomas clínicos, afetando a pele, pulmões, coração, sistema nervoso central, ossos e articulações, corrente sanguínea e trato gastrointestinal (BACHERT, GEVAERT e VAN CAUWENBERGE, 2002).

Muitos fatores de virulência contribuem para o potencial patogênico de *S. aureus*. Algumas linhagens podem vir a formar uma cápsula de natureza polissacarídica, contribuindo para impedir a fagocitose do microrganismo por células de defesa. Podem produzir e secretar a proteína A, a qual tem alta afinidade pela região Fc das moléculas de IgG, dificultando a ação do sistema imunológico. Produzem, além disso, uma série de enzimas, como a catalase, responsável pela degradação do peróxido de hidrogênio, e a coagulase, responsável pela formação de fibrina, que confere resistência a opsonização e fagocitose (KONEMAN et al., 2001). Além disso, *S. aureus* produz uma série de toxinas, às quais têm sido atribuída uma importante participação na patogenia das doenças causadas por este microrganismo. Entre as toxinas produzidas, destacam-se as enterotoxinas, a esfoliatina, toxina da síndrome do choque tóxico (TSST), hemolisinas e leucocidinas (TRABULSI, TEIXEIRA e BUERIS, 2004).

Staphylococcus aureus pode causar vários tipos de intoxicações, seja durante um processo infeccioso, como por exemplo a síndrome da pele escaldada, ou não, como nos casos da intoxicação alimentar e síndrome do choque tóxico. A intoxicação alimentar é provocada pela ingestão de toxinas formadas no alimento contaminado pelo microrganismo. Essas toxinas são denominadas enterotoxinas estafilocócicas (BACHERT, GEVAERT e VAN CAUWENBERGE, 2002).

3.2 Enterotoxinas Estafilocócicas

Enterotoxinas estafilocócicas (EE) são proteínas secretadas com massa molecular variando entre 25.000 a 30.000 daltons, solúveis em água e em soluções salinas, que apresentam estrutura primária, estrutura molecular e atividades farmacológicas semelhantes entre si, possuindo, entretanto, propriedades imunológicas distintas (LEBEAU et al., 1994; NOVAK, 1999; BALABAN e RASOOLY, 2000).

À medida que foram sendo descobertas, as EE foram seqüencialmente denominadas com as letras do alfabeto, sendo descritas e purificadas, até o momento, dez EE: EEA, EEB, EEC₁, EEC₂, EEC₃, EED, EEE, EEG, EEH e EEI. Inicialmente, as EE foram divididas em 5 tipos sorológicos (EEA até EEE), as chamadas EE clássicas. Atualmente, estudos baseados na similaridade genética existente entre as clássicas e as novas EE têm reportado outros tipos (FITZGERALD et al., 2001; JARRAUD et al., 2001; ORWIN et al., 2002; OMOE et al., 2003; LETERTRE et al., 2003c; THOMAS et al., 2006). Como exemplo, Abe et al. (2000) *apud* Bachert, Gevaert e Van Cauwenberge (2002), usando a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), identificaram uma variante da EEG, a EEGv, produzida por isolados clínicos de *Staphylococcus aureus*. Corroborando este estudo, Blaiotta et al. (2004), relataram variantes genéticas dos genes codificadores das EEG (EEGv) e EEI (EEIv) em uma cepa de *Staphylococcus aureus*.

Em função do crescente relato de novas EE, e buscando uma padronização da nomenclatura, o Comitê Internacional para Nomenclatura de Superantígenos Estafilocócicos (INCSS) recomendou que apenas superantígenos estafilocócicos que induzam emese em macacos sejam designados Enterotoxinas Estafilocócicas, enquanto que as recentes enterotoxinas descritas, cujas propriedades eméticas ainda não estão totalmente esclarecidas, sejam designadas apenas como “similares”, ou pelo termo original em inglês, “*like*”, acrescentando-se à sua sigla a letra “l”, até a elucidação do exato mecanismo celular e molecular envolvido em sua patogênese (LINA et al., 2004).

Na Tabela 1 são apresentadas as EE e as EEI descritas na literatura.

Tabela 1: Enterotoxinas produzidas por *Staphylococcus aureus*.

ENTEROTOXINA	SIGLA	REFERÊNCIA
A	EEA	CASMAN, (1960)
B	EEB	BERGDOLL, SURGALLA e DACK, (1959)
C1	EEC ₁	BERGDOLL, BORJA e AVENA, (1965)
C2	EEC ₂	AVENA e BERGDOLL, (1967)
C3	EEC ₃	REISER et al., (1984)
D	EED	CASMAN et al., (1967)
E	EEE	BERGDOLL et al., (1971)
G	EEG	MUNSON et al., (1998)
H	EEH	SU e WONG, (1995)
I	EEI	MUNSON et al., (1998)
J	EelJ	ZHANG, IANDOLO e STEWART, (1998)
K	EEIK	ORWIN et al., 2001
L	EEIL	FITZGERALD et al., (2001)
M	EEIM	JARRAUD et al., (2001)
N	EEIN	JARRAUD et al., (2001)
O	EEIO	JARRAUD et al., (2001)
P	EEIP	KURODA et al., 2001
Q	EEIQ	ORWIN et al., (2002)
R	EEIR	OMOE et al., (2003)
U	EEIU	LETERTRE et al., (2003c)
U2	EEIU2	THOMAS et al., (2006)
V	EEIV	THOMAS et al., (2006)

Em 1981, Bergdoll et al. identificaram uma toxina produzida por *Staphylococcus aureus*, causadora de síndrome do choque tóxico, a qual, pela ordem de descobrimento portaria a sigla “EEF”. No entanto, essa toxina foi renomeada com a sigla TSST-1 devido à ausência de atividade emética em macacos (SU e WONG, 1997; FUEYO, MENDOZA e MARTÍN, 2005), o que, conforme descrito acima, é uma evidência absolutamente necessária para a caracterização da enterotoxina.

Entre as bactérias pertencentes ao gênero *Staphylococcus*, *S. aureus* é a espécie mais envolvida com intoxicação alimentar estafilocócica e, por muitos anos, foi a única relacionada com produção de EE, porém, sabe-se que *S. hyicus* e *S. intermedius* também podem produzir EE em níveis suficientes para causar intoxicação alimentar (LANCETTE e BENNETT, 2001; BECKER et al., 2001, LAMPRELL et al., 2004). Com o intuito de padronizar a nomenclatura das EE produzidas por *S. hyicus* e *S. intermedius*, o INCSS recomenda que a sigla da EE sinalize a espécie bacteriana

produtora: por exemplo, uma variante molecular de EEC, produzida por *S. intermedius*, deve ser designada como “E(int)EC” (LINA et al., 2004).

Diferentes hipóteses têm sido reportadas visando esclarecer a variação nos tipos de enterotoxinas produzidas por *Staphylococcus*. Entre essas, destacam-se as de Rosec et al. (1997), os quais afirmam que os distintos tipos de enterotoxinas produzidas por isolados de *S. aureus* são reflexo da origem geográfica do microrganismo. Cenci-Goga et al. (2003), da mesma forma, afirmam que essas diferenças podem ser reflexo da diversidade dos isolados de *S. aureus* e de suas origens. Balaban e Rasooly (2000) e Chen et al. (2001), sugerem que a heterogeneidade das toxinas produzidas deve-se a uma seleção genética, promovendo modificação das seqüências de seus aminoácidos, causando imunossupressão no hospedeiro, facilitando a sobrevivência de *S. aureus*. Por isso, o INCSS recomenda uma designação apropriada para variantes únicas de EE encontradas em determinado hospedeiro: por exemplo, uma variante molecular de EEC expressada exclusivamente por linhagens de *Staphylococcus* isoladas de bovinos, deve ser designada “EEC4-bov” (LINA et al., 2004).

As EE possuem uma estreita identidade genética entre si, sendo sua relação filogenética estimada pela análise da seqüência de nucleotídeos de seus respectivos genes. A seqüência nucleotídica divergente, bem como diferenças nas seqüências de aminoácidos, permitiu dividi-las, de maneira hierárquica, em dois grandes grupos. O primeiro grupo é formado por EEA, EED e EEE, as quais apresentam similaridade de seqüência na sua cadeia de aminoácidos variando entre 51 e 81%. O segundo grupo compreende EEB e os subtipos de EEC, com uma seqüência similar de 42 a 67%. EEIJ, assim como EEI e EEH foram caracterizadas mais recentemente, e têm uma similaridade com as outras enterotoxinas variando entre 52 e 66% e 31 e 38%, respectivamente (BALABAN e RASOOLY, 2000). Estudos mais recentes sobre o genoma de *Staphylococcus aureus* enterotoxigênico demonstraram uma alta similaridade entre EEIU e EEB (54%), EEIU e EEC (52%), EEIU e EEG (40%) (LETERTRE et al., 2003c) e entre EEIR e EEG (OMOE et al., 2003).

O alto grau de similaridade entre as EE pode ser melhor observado na Tabela 2.

Tabela 2: Porcentagem de similaridade entre as seqüências de aminoácidos em diferentes EE* e EEI**

EE	EEA	EEB	EEC ₁	EED	EEE	EEG	EEH	EEI	EEIJ	EEIK	EEIL	EEIM	EEIN	EEIO
EEA	100	33	30	50	83	27	37	39	64	39	37	35	39	37
EEB		100	68	35	32	43	33	31	33	32	36	29	32	36
EEC ₁			100	31	29	41	27	26	30	29	29	26	29	33
EED				100	52	27	35	33	51	38	39	41	38	39
EEE					100	27	35	35	63	39	37	37	39	37
EEG						100	34	28	29	31	30	28	31	30
EEH							100	33	35	38	34	38	34	31
EEI								100	34	31	31	31	31	57
EEIJ									100	38	42	38	42	33
EEIK										100	42	28	-	-
EEIL											100	31	-	-
EEIM												100	28	31
EEIN													100	42
EEIO														100

Fonte: Adaptado de JARRAUD et al. (2001);

* Enterotoxina Estafilocócica;

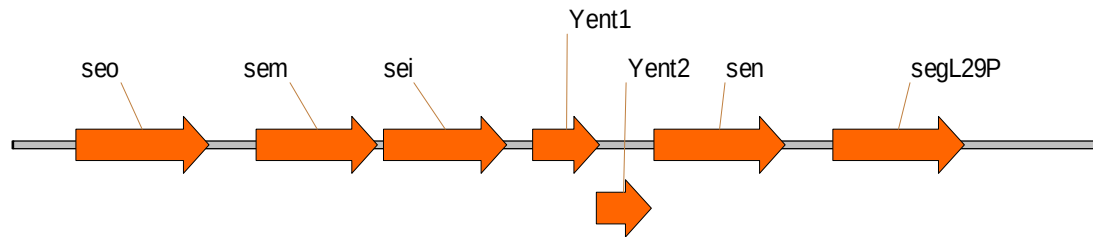
** Enterotoxina Estafilocócica *like*.

Uma das formas de organização dos genes das enterotoxinas estafilocócicas é denominada ilha de patogenicidade (SaPI), que são classificadas como elementos genéticos acessórios que possuem tamanho entre 15 e 20 kb, e que ocupam posições específicas no cromossomo de cepas toxigênicas. Inicialmente foram descritas cinco ilhas de patogenicidade em *S. aureus*: SaPI 1, SaPI 2, SaPI 3, SaPI 4 e SaPI_{bov} (NOVICK, SCHLIEVERT e RUZIN, 2001), as quais portavam genes para fatores de virulência do microrganismo. Sabe-se, por exemplo, que SaPI 1 possui os genes das EEIK e EEIL, SaPI 3 o gene das EEB, EEIK e EEIQ (YARWOOD et al., 2002) e SaPI 4 o gene da EEC EEIK, EEIL e EEIM (NOVICK, 2003). Em um estudo conduzido por Fitzgerald et al. (2001), uma análise genético-molecular permitiu a identificação de uma ilha de patogenicidade em *Staphylococcus aureus* isolados de bovinos, denominada SaPI_{bov}, onde se encontravam os genes codificadores de TSST, EEC-bov e EEIL.

Os genes codificadores de EE, assim como outros que codificam fatores de virulência de *Staphylococcus*, também podem estar dispostos em elementos genéticos móveis, tais quais os plasmídeos, os bacteriófagos e os elementos genéticos transponíveis (NOVICK et al., 2001; YARWOOD et al., 2002). Sabe-se que EEA e EED, por exemplo, as duas enterotoxinas com a maior frequência de envolvimento em intoxicação alimentar estafilocócica, são codificadas por genes localizados em bacteriófago (BETLEY e MEKALANOS (1985) *apud* NOVICK, 2003) e plasmídeo

(BAYLES e IANDOLO (1989) *apud* NOVICK, 2003; ZHANG, IANDOLO e STEWART, 1998), respectivamente. A presença de genes para fatores de virulência em elementos genéticos móveis numa cepa de *Staphylococcus aureus*, como, por exemplo, algum gene que codifique resistência a um antibiótico ou uma enterotoxina, implica em sua possível mobilidade de uma molécula de DNA para outra, ou de uma bactéria para outra, num processo conhecido como transferência horizontal de genes, conferindo uma vantagem seletiva e evolutiva ao microrganismo receptor (FERREIRA, 2001; YARWOOD et al., 2002).

Em virtude da grande similaridade existente entre os genes codificadores das EE, supõe-se que grande parte desses genes apresente algum nível de “parentesco” com outras seqüências de EE dentro do mesmo genoma. Estas seqüências estreitamente relacionadas poderiam ser produtos da duplicação de genes ancestrais (JARRAUD et al., 2001) que, posteriormente, divergiram entre si, em níveis variados, pela ocorrência de mutações acumuladas ao longo da evolução. Uma série de genes, descendentes de um gene ancestral comum, é chamada família de genes (FERREIRA, 2001). A organização dos diferentes membros de uma determinada família de genes dentro do genoma é variável e, quando agrupados numa mesma região, formam os chamados agrupamentos de genes, ou, no termo em inglês, *clusters*. Um dos agrupamentos presentes no genoma de *S. aureus* é denominado *egc* ou *enterotoxin gene cluster*, uma organização genética sob a forma de operon e que codifica a produção de cinco enterotoxinas: EEG, EEI, EEIM, EEIN e EEIO (JARRAUD et al., 2001, KURODA et al., 2001), além de dois pseudogenes, denominados *øpent1* e *øpent2*, ambos sem função biológica definida. Embora os genes do agrupamento *egc* sejam regulados pelo mesmo regulador, o mRNA policistrônico gerado pode ser traduzido individualmente para cada gene e em níveis distintos. O agrupamento *egc* está esquematicamente representado na Figura 1.



S aureus - cluster egc AF285760

6418 bp

Figura 1: Representação esquemática do *agrupamento egc* mostrando os genes *selo*, *selm*, *sei*, ϕ *ent1*, ϕ *ent2*, *seln* e *seg*. (número de acesso no GenBank – AF285760).

Fonte: JARRAUD et al., (2001); NCBI (2008).

Essa organização genética foi confirmada posteriormente com o seqüenciamento do genoma de *Staphylococcus aureus* (KURODA et al., 2001).

O agrupamento *egc* é descrito por alguns autores (JARRAUD et al., 2001; THOMAS et al., 2006) como “berço” das EE, onde, a partir de eventos de recombinação genética, poderia ser formado um novo gene codificador de um superantígeno estafilocócico capaz de causar intoxicação alimentar. Comprovando essa hipótese, Letertre et al. (2003c), identificaram um gene variante no *agrupamento egc*, denominado *selu*, que foi formado a partir da recombinação genética entre ϕ *ent1* e ϕ *ent2*, e que codifica EEIU. Posteriormente, Thomas et al. (2006) identificaram dois novos genes codificadores de EE, o primeiro denominado *selu2*, originado a partir da recombinação de ϕ *ent1* e ϕ *ent2*, e o segundo denominado *selv*, originado a partir de eventos de recombinação genética entre os genes codificadores de *selm* e *sei*. Embora ambos os genes *selu* e *selu2* tenham sido formados a partir dos mesmos genes (ϕ *ent1* e ϕ *ent2*) e tenham uma seqüência de nucleotídeos bastante similar, diferem significativamente a ponto de produzirem proteínas diferentes e com atividade superantigênica.

Uma característica interessante do *agrupamento egc* é o alto nível de polimorfismo genético que este agrupamento pode apresentar (LETERTRE et al., 2003c; BLAIOTTA et al., 2004; BLAIOTTA et al., 2006; THOMAS et al., 2006), sendo encontrado diversas variantes em distintas linhagens de *S. aureus*. Thomas et al. (2006), por exemplo, analisaram 666 cepas clínicas de *S. aureus* e encontraram apenas

uma que não apresentava o gene *sei*, na qual observaram que havia dois tipos de seqüência de inserção posicionados na região cromossômica onde deveria estar localizado o gene *sei*. Esses autores sugerem que esse fenômeno é causado quando parte do *agrupamento egc* é exportado ou inserido no cromossomo de cepas intermediárias de *S. aureus*, e que, durante a transposição, pode ter ocorrido a integração total ou parcial de um gene adjacente.

As EE são descritas como proteínas acessórias, ou seja, não são utilizadas para o crescimento e multiplicação do microrganismo. Além disso, são denominadas superantígenos por possuírem atividade superantigênica, ou seja, possuem a capacidade de estimular os linfócitos T auxiliares de forma não específica através da molécula do complexo principal de histocompatibilidade da classe II (MHC II) das células apresentadoras de antígenos (Figura 2). Dessa forma, essa união ocorre de uma maneira indiscriminada e em grande abundância, podendo originar uma variedade de sintomas, como febre, náuseas, vômitos e até mesmo choque (TRABULSI, TEIXEIRA e BUERIS, 2004).

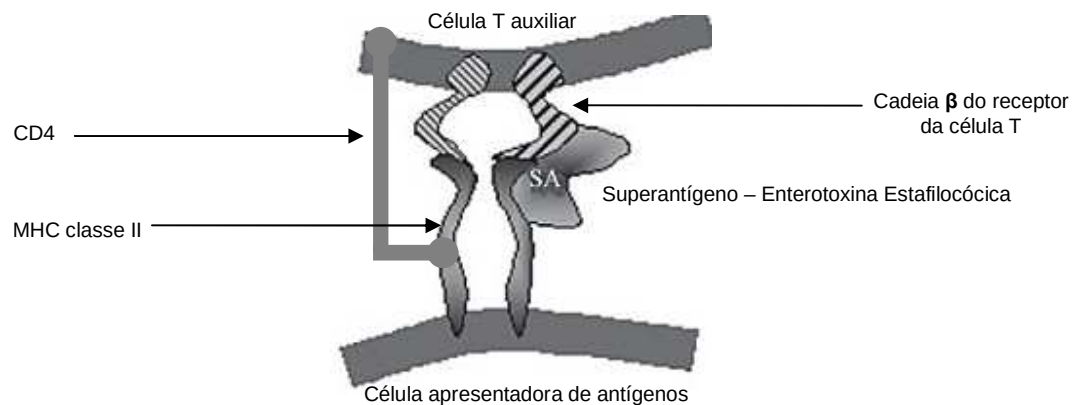


FIGURA 2: Representação da ativação não específica de células T através de enterotoxinas estafilocócicas.

FONTE: Adaptado de LOIR, BARON e GAUTIER, (2003).

Sabe-se que a quantidade de EE requerida para ativação de células T é muito menor que a requerida para uma resposta de um antígeno convencional, no entanto, a quantidade de interleucina produzida é significativamente maior numa resposta à EE. Embora náuseas e vômitos exibidos em intoxicação alimentar estafilocócica sejam

atribuídos à grande quantidade de interleucina liberada como consequência da elevada ativação de células T, o completo mecanismo molecular que induz a emese não está totalmente elucidado. Sabe-se, no entanto, que a severidade da intoxicação alimentar estafilocócica depende da enterotoxina envolvida assim como da quantidade de EE ingerida com o alimento (BETLEY e HARRIS, 1994; BALABAN e RASOOLY, 2000; PROFT e FRASER, 2003). Como exemplo, pode ser citada a intoxicação causada pela EEB, onde menores quantidades desta toxina exibem sintomas mais severos do que a causada pela EEA.

A via de absorção da EE está também relacionada com a severidade da doença. Estima-se que, via gastrointestinal, é necessário uma quantidade de 0,375µg de enterotoxina por quilo corpóreo para causar sintomatologia clássica de intoxicação alimentar em humanos (FRANCO e LANDGRAF, 2002). Ulrich et al. (1997), afirmam que, em humanos, quando as EE são administradas por via intra-nasal, a dose aproximada de 0,0004µg por quilo corpóreo, seria suficiente para gerar sintomas como febre, mialgia, dispnéia, náuseas, anorexia e vômitos. Estes mesmos autores estimaram que a dose letal em humanos, quando a EE é administrada por via inalatória, seria apenas 0,02µg por quilo corpóreo. O potencial da doença causada por EE, principalmente EEB, quando administrada por via intra-nasal, foi extensivamente estudada nos Estados Unidos na década de 1960, sendo cogitada, na época, como um potencial agente biológico a ser utilizado em programas bélicos (ULRICH et al., 1997).

Embora uma mesma cepa de *S. aureus* possa albergar diversos genes de EE, a secreção destas proteínas é cepa-específica e varia de acordo com os fatores intrínsecos e extrínsecos do substrato em que microrganismo esteja inserido. Como exemplos, podem ser citados meios de cultura contendo glicose ou NaCl, os quais, em determinadas concentrações, reprimem a transcrição do RNA que conduz a informação para codificação de EEA e EEC e de EEB e EEC, respectivamente (WESELL, 2000). Com relação a outros fatores, Su e Wong (1998), verificaram que, em condições de laboratório, *S. aureus* produz grandes quantidades de EEH quando incubado em condições aeróbicas e sob um pH 7,0, no entanto, quando incubado em pH 6,5 e/ou 7,5, as quantidades de EEH detectadas foram significativamente menores.

As EE podem ser produzidas por *S. aureus* durante a multiplicação inicial na fase exponencial (fase log) do microrganismo e/ou durante, e até mesmo, no fim da fase exponencial e início da fase estacionária, contudo, estima-se que sejam necessárias entre 10^5 e 10^6 unidades formadoras de colônias (UFC) da bactéria por grama de alimento para que a toxina seja formada em níveis capazes de provocar intoxicação alimentar (FRANCO e LANDGRAF, 2002). Em alimentos, merece destaque o trabalho de AKKAYA e SANCAK (2007), os quais inocularam, individualmente, 10^5 UFC de *S. aureus* produtores de EEA, EEB, EEC e EED, por mililitro de leite pasteurizado, que posteriormente foi utilizado para fabricação de um queijo típico da Turquia. Estes autores verificaram que, já durante a formação do coágulo, houve um acréscimo de 2log na quantidade de *S. aureus* presentes e que foi possível detectar EEA. Já EEC somente foi detectada no décimo quinto dia após a cura do queijo, quando a população de *S. aureus* encontrava-se em 6log. Nesse experimento, até o nonagésimo dia após a cura do queijo, EEB e EED não foram detectadas. Com esses resultados é possível sugerir que a síntese e secreção de EE não é uma consequência inevitável do crescimento de *S. aureus*, podendo o microrganismo se multiplicar sem que ocorra a síntese de EE.

Nos últimos anos a concentração mínima de *S. aureus* capaz de produzir enterotoxinas em quantidade suficiente para causar doença vem sendo relacionada a sistemas de regulação gênica. Holloway (2006) relata que essa regulação gênica é dependente da densidade populacional bacteriana, através da produção e liberação no meio externo de pequenas moléculas, chamadas de “auto-indutores”, em um fenômeno denominado de *quorum sensing*, o que também foi descrito por Winzer e Williams (2001), os quais citam que a relação entre patógenos e hospedeiros é fortemente afetada pela população bacteriana presente. Segundo Holloway (2006), muitas moléculas diferentes já foram descritas como auto-indutores. Alguns dos principais exemplos são (i) as acil-homoserina-lactonas (AHLs), moléculas também chamadas de “auto-indutor 1”; (ii) moléculas agrupadas sob o nome de “auto-indutor 2”, de estrutura geral ainda desconhecida, sabendo-se apenas que não são AHLs (em alguns casos observou-se ser um açúcar com uma molécula de boro no centro); e (iii) pequenos peptídeos modificados. Bactérias Gram-negativas como *Pseudomonas aeruginosa*,

usam várias versões de moléculas AHL, por outro lado, em bactérias Gram-positivas, como *Staphylococcus aureus*, as moléculas auto-indutoras seriam peptídeos.

O sistema de sinalização através de auto-indutores baseia-se na sua ligação a moléculas sensoras presentes na superfície ou no interior das bactérias. Essas moléculas sensoras, chamadas em geral de “proteínas R”, atuam como reguladores transcricionais, ou seja, regulam a expressão de genes específicos, direta ou indiretamente. Cada uma dessas proteínas R responde a um auto-indutor específico e, em geral, só é ativada quando estimulada por essa molécula. Auto-indutores inespecíficos, embora capazes de se ligar às proteínas R, não provocam ativação ou provocam uma ativação mais fraca (WINZER e WILLIAMS, 2001; HOLLOWAY, 2006). Esses mesmos autores citam que, entre as características reguladas por *quorum sensing*, a expressão de enzimas e antibióticos em *Erwinia carotovora*, a produção de pigmento em *Chromobacterium violaceum* e de luminescência em *Vibrio harveyi* e *Vibrio fischeri*, a produção de fatores de virulência em *Pseudomonas aeruginosa*, a capacidade de receber DNA de outras bactérias em *Bacillus subtilis*, a conjugação (transferência de genes entre duas bactérias) em *Agrobacterium tumefaciens* e *Enterococcus faecalis*, e a expressão de toxinas em *Staphylococcus aureus*. A respeito disso, Motta et al. (2001) relatam que algumas enterotoxinas estafilocócicas (EEB, EEC, EED) têm sua síntese regulada através de um mecanismo de *quorum sensing* onde peptídeos atuam na ativação de um gene regulador acessório (gene *agr*), enquanto outras (EEA), são independentes deste sistema, o que pode explicar os elevados índices de intoxicação alimentar estafilocócica geradas por EEA. Estes fatos sugerem que estratégias alternativas, baseadas no controle de sistemas *quorum sensing*, podem ser utilizadas como substituintes aos antibióticos, no caso de medicamentos, e de tratamentos térmicos para o controle de patógenos, como os *Staphylococcus* coagulase positiva e suas enterotoxinas, em alimentos.

Duas das características mais importantes das EE são: primeiro, a resistência à inativação por proteases gastrintestinais, bem como à ação da pepsina, o que explica sua capacidade de permanecer ativa após a ingestão, e a manutenção de sua atividade em certos alimentos; e, segundo, sua termoestabilidade, extremamente importante em termos de segurança de alimentos, uma vez que elas permanecerão ativas no alimento

mesmo após seu processamento térmico (BALABAN e RASOOLY, 2000; ATANASSOVA, MEINDL e RING, 2001; SORIANO et al., 2002; BENNETT, 2005), como no caso de leite pasteurizado e leite tratado por ultra alta temperatura (UHT).

3.3 Intoxicação Alimentar Estafilocócica

Intoxicação alimentar estafilocócica é uma doença de origem alimentar, caracterizada por um curto período de incubação, geralmente 2 a 6 horas, resultado da ingestão de enterotoxinas estafilocócicas pré-formadas no alimento (BALABAN e RASOOLY, 2000).

Para a intoxicação alimentar estafilocócica acontecer, quatro fatores relacionados ao alimento devem ser considerados: **1)** estar contaminado com estafilococos produtores de EE; **2)** apresentar condições intrínsecas para a multiplicação do microrganismo; **3)** estar acondicionado à uma temperatura e por um período adequados à multiplicação bacteriana até níveis capazes de produzir EE em quantidade suficiente para causar doença; e **4)** ser consumido (NEWSOME e STEWART, 2006).

Staphylococcus aureus é, no gênero *Staphylococcus*, a espécie mais relacionada à intoxicação alimentar estafilocócica, no entanto, não é o microrganismo em si o causador da doença e, sim, suas toxinas (NOVICK, 2003). Intoxicação alimentar estafilocócica tem um grande impacto na saúde pública. Estima-se que, a cada ano, nos Estados Unidos, ocorram mais de 185.000 casos dessa doença, causando cerca de 1.700 hospitalizações (MEAD et al., 1999), com custos médicos e perda em produtividade estimada na ordem de 1,5 bilhão de dólares (CENCI-GOGA et al., 2003). Na França, durante os anos de 1999 e 2000, o número de casos e surtos de doenças alimentares causadas por *Staphylococcus aureus* ocupou a segunda posição, sendo superado apenas por *Salmonella* spp. (LOIR, BARON e GAUTIER, 2003). No Brasil, poucas Unidades de Federação possuem um sistema de monitoramento epidemiológico de doenças transmitidas por alimentos. Merece destaque o Estado do Paraná, onde, no período compreendido entre os anos de 1978 e 2000, a intoxicação alimentar estafilocócica ocupou o primeiro lugar no ranking de doenças transmitidas por

alimentos, com 492 surtos (41,2% no total) (AMSON et al., 2006). No entanto, os casos e surtos desta doença ainda são subestimados por várias razões, entre as quais se destacam: a doença apresenta um caráter autolimitante e raramente leva as pessoas envolvidas a procurarem auxílio médico; ser confundida com outros tipos de intoxicação alimentar que possuem sintomas semelhantes, como, por exemplo, a causada pela toxina emética de *Bacillus cereus*; inadequada coleta de amostras e análise laboratorial (BENNETT, 1986 *apud* NEWSOME e STEWART, 2006).

Staphylococcus aureus pode produzir uma ou mais EE simultaneamente (LETERTRE et al., 2003a; LETERTRE et al., 2003b; PINTO, CHENOLL e AZNAR, 2005; VILLARD et al., 2005; SILVA, CARMO e SILVA, 2005; OMOE et al., 2005; ZSCHÖCK et al., 2005; SMYTH et al., 2006). Embora *S. aureus* possa produzir uma grande variedade de enterotoxinas, apenas EEA, EEB, EEC₁, EEC₂, EEC₃, EED, EEE, EEG, EEH e EEI foram envolvidas em casos e surtos de intoxicação alimentar (PROFT e FRASER, 2003), sendo 95% dos surtos causados por EEA, EEB, EEC, EED e EEE (LETERTRE et al., 2003a). No entanto, este índice pode não se dever à alta incidência dessas EE clássicas e, sim, à subnotificação de outras EE, em função da limitação dos métodos diagnósticos comerciais que não detectam a presença destes novos agentes em alimentos.

Devido à alta similaridade genética entre as enterotoxinas, e o possível envolvimento de novas EE em intoxicação alimentar, muitas pesquisas têm sido conduzidas buscando a detecção de novos genes de enterotoxinas estafilocócicas. Essas investigações ocorrem, na maioria das vezes, em cepas de origem clínica, que estiveram envolvidas em doenças de humanos, ou em cepas de referência, pertencentes à coleções bacterianas de referência, entre elas, *American Type Culture Collection* (ATCC) e *Food Research Institute* (FRI). Como exemplo, pode ser citado o estudo de Becker et al. (2004), os quais detectaram genes codificadores das EEIM, EEIN e EEIO em *S. aureus* isolados de amostras clínicas; o estudo de Chen, Chiou e Tsen (2004), os quais encontraram genes codificadores de EEG, EEH e EEI em *S. aureus* isolados de humanos e que não apresentaram genes para as EE clássicas; e o estudo de Omoe et al. (2005) que padronizaram uma técnica molecular para

genotipagem de *S. aureus* isolados de surtos e de humanos sadios, encontrando 49 isolados que portavam apenas os genes de EEI.

Por outro lado, os estudos com cepas oriundas de alimentos são ainda bastante incipientes, limitando-se, na sua maioria, às EE clássicas (EEA-EEE). Com relação à cepas isoladas de alimentos de origem animal, merece destaque o trabalho de Bania et al. (2006), os quais relataram uma alta incidência dos genes das EEIP, EEIL e EEIK em genomas de *S. aureus* isolados de derivados cárneos.

A pesquisa de *S. aureus* enterotoxigênicos em animais é de extrema relevância uma vez que quando esses animais são destinados à alimentação humana, durante o processo de abate, há possibilidade de contaminação da carne através do contato com pele, pêlos, penas, conteúdo gastrointestinal ou fezes dos animais abatidos. Nesse aspecto, Zschöck et al. (2005) detectaram a presença de genes codificadores de EEG, EEH, EEI e EEIJ em *S. aureus* isolados em bovinos e ressaltam sua importância para estudos epidemiológicos futuros, com o possível envolvimento destas enterotoxinas em casos e surtos de intoxicação alimentar. Smyth et al. (2005) e Hwang et al. (2007), isolaram *S. aureus* em carcaças de frango e verificaram que uma alta porcentagem das cepas isoladas portava os cinco genes do *agrupamento egc*.

Smyth et al. (2006), pesquisando *S. aureus* enterotoxigênicos em refrigeradores domésticos na Irlanda, encontraram os genes de EEG, EEI, EEIM, EEIN e EEIO em 99% das linhagens toxigênicas por eles isoladas, e afirmam que essa alta frequência indica que refrigeradores domésticos contaminados com *S. aureus* são potencialmente capazes de veicular esse patógeno para os alimentos.

Os sintomas clássicos da intoxicação alimentar estafilocócica são náuseas, vômitos, câibras abdominais geralmente muito dolorosas, diarreia e sudorese. Podem ocorrer, ainda, dores de cabeça, calafrios, queda de pressão arterial e, em raríssimas vezes, febre, quando a quantidade de toxina ingerida é grande (FRANCO e LANDGRAF, 2002). Varnan e Evans (1991) citam que crianças, idosos e pessoas enfermas são mais susceptíveis à intoxicação estafilocócica, ainda que faixa etária e doença pré-existente não sejam fatores predisponentes à esta doença.

Após a ingestão, as EE apresentam ação emética, através de estímulo do sistema nervoso central, onde se encontra o centro do vômito, provocando o

retroperistaltismo. A ação diarreica ocorre através de um mecanismo que não está totalmente elucidado, mas parece estar relacionado ao sistema secretor de sódio e cloro em nível intestinal, provocando desequilíbrio hidro-eletrolítico (FRANCO e LANDGRAF, 2002).

Os sintomas observados pela ingestão de alimentos contendo EE variam com o grau de susceptibilidade do indivíduo, com a concentração de EE presente no alimento e com a quantidade de alimento ingerido (FRANCO e LANDGRAF, 2002). De acordo com Evenson *et al.* (1988), a dose mínima de EEA requerida para causar doença em crianças em idade escolar é de aproximadamente 144 ± 50 ng, conforme observado num surto ocorrido nos Estados Unidos, após a ingestão de leite achocolatado. No entanto, Franco e Landgraf (2002) descrevem que $0,375 \mu\text{g}$ de enterotoxina por quilo corpóreo seja suficiente para causar a sintomatologia em humanos.

Entre as EE clássicas, EEA é responsável por mais de 75% dos surtos, seguida, em ordem decrescente de frequência, por EED, EEC e EEB (VERNOZY-ROZAND *et al.*, 2004). De uma maneira geral, o gene da EEA é o mais prevalente em isolados de *Staphylococcus aureus*, no entanto, novas evidências sugerem que essa prevalência pode variar entre distintos países como, por exemplo, na Coreia, em um estudo conduzido por Kwon *et al.* (2004), o gene da EEI foi o mais prevalente, seguido pelos genes da EEA e EEH.

Vários casos e surtos já foram reportados na literatura. Como exemplos podem-se citar um grande surto no Japão, ocorrido no ano de 2000, no qual adoeceram, aproximadamente, 14.000 pessoas, com 180 hospitalizações (WHO, 2004). Martín *et al.* (2004) descreveram três surtos de intoxicação alimentar na Espanha, envolvendo enterotoxinas A, C, G, H e I. Chen, Chiou e Tsen (2004) relataram surtos de intoxicação alimentar em Taiwan e isolaram *S. aureus* produtores das enterotoxinas G, H e I. Jorgensen *et al.* (2005), após um surto de intoxicação alimentar estafilocócica na Noruega, encontraram EEH em um purê de batatas preparado com leite cru.

No Brasil, existem diversos relatos de intoxicação alimentar estafilocócica: Karino *et al.* (1985), na cidade de Paranavaí, PR, relataram um surto de intoxicação alimentar ocasionado por *S. aureus* cujo alimento veiculador das EE foi um bolo de casamento; na cidade de Ouro Preto, MG, Sabione, Hirooka e Souza (1988),

detectaram *S. aureus* produtores de EEA, EEB, EED e EEE em queijo tipo Minas, ocasionando um surto em uma família de quatro pessoas; no ano de 1994, um surto foi diagnosticado por Pereira et al., no sudeste do Brasil, onde 12 pessoas foram acometidas de vômito e diarreia após consumirem um bolo recheado, servido em uma festa de aniversário; Barreto e Costa (1998), descreveram um surto de intoxicação estafilocócica em Belo Horizonte, MG, causado pelo consumo de ambrosia, queijo não processado e saladas; no Estado de Minas Gerais dois surtos foram diagnosticados por Carmo et al. (2002): um deles envolvendo queijo Minas frescal, no qual foi encontrado EEA, EEB e EEC e, no outro, envolvendo leite cru, no qual foram encontradas EEC e EED. Veras et al. (2003), investigaram surtos de toxinfecção alimentar envolvendo leite e produtos derivados no estado de Minas Gerais, e constataram que os principais agentes causadores foram *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus* coagulase negativa enterotoxigênicos, e que as principais toxinas envolvidas nos surtos foram EEA, EEB e EEC. Rodrigues et al. (2004), na cidade de Pelotas, RS, encontraram EEA em sanduíche de galinha após um surto no qual adoeceram 56 pessoas. Como no Brasil não há obrigatoriedade de notificação da doença, é possível afirmar que o país apresenta índices subestimados de intoxicação alimentar estafilocócica. O caráter autolimitante da doença, com uma sintomatologia branda e de curta duração, faz com que os casos e surtos desse tipo de intoxicação raramente levem as pessoas envolvidas a procurarem auxílio médico, de forma que o índice de hospitalização, e conseqüente notificação, seja relativamente baixo.

O isolamento e determinação da enterotoxigenicidade da cepa de *Staphylococcus* isolada em alimentos indicam o potencial para a produção de enterotoxinas. Além disso, a presença do microrganismo em altos níveis pode indicar uso inadequado do binômio tempo-temperatura no processamento e/ou armazenamento dos alimentos, condição em que *S. aureus* pode desenvolver-se até níveis suficientes para produzir enterotoxina em concentração capaz de causar doença (BENNETT, 2005). Já a determinação do tipo de EE é um fator importante na investigação epidemiológica de casos e surtos da doença (LANCETTE e BENNETT, 2001), e sua identificação nos alimentos pode indicar a possível fonte de contaminação (NÁJERA-SANCHEZ et al., 2003), tendo em vista que foi demonstrado que EEA e EEB

são associadas com contaminação de origem humana, através de manipuladores de alimentos, e que EEC e EED são associadas com contaminação a partir de animais, geralmente bovinos e suínos (HIROOKA et al., 1988; NÁJERA-SANCHEZ et al., 2003; CENCI-GOGA et al., 2003).

Lancette e Bennett (2001) afirmam que o significado da presença de *Staphylococcus aureus* em alimentos deve ser interpretado com cautela, pois uma grande quantidade de microrganismos não é suficiente para incriminar o alimento como causador de intoxicação alimentar, assim como sua ausência ou presença em pequenas contagens não indica que o alimento não representa perigo do ponto de vista de segurança de alimentos. O potencial risco de intoxicação alimentar estafilocócica somente pode ser determinado após a confirmação da enterotoxigenicidade do microrganismo isolado e/ou após a demonstração da presença de enterotoxinas no alimento. No entanto, a legislação brasileira, estabelecida pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) do Ministério da Saúde (MS), através da RDC Nº 12, de 2 de Janeiro de 2001 (BRASIL, 2001), determina limites máximos para presença de estafilococos coagulase positiva em alimentos, considerando os alimentos com altas contagens do microrganismo como impróprios para o consumo e potencialmente capazes de causar enfermidade. Por outro lado, a pesquisa de EE em alimentos não é estabelecida pela legislação, entretanto, para avaliar um potencial risco da ocorrência de intoxicação alimentar, utiliza-se a pesquisa da enzima coagulase, um teste bioquímico utilizado como marcador de enterotoxigenicidade (VARNAN e EVANS, 1991; LAMPRELL et al., 2004). Cepas de *Staphylococcus* que não produzem coagulase são denominadas “Estafilococos coagulase negativa”, e tem uma significativa participação em infecções humanas, particularmente em ambiente hospitalar, em pacientes com defesas orgânicas comprometidas ou portadores de corpos estranhos, tais como próteses, catéteres e enxertos sintéticos. A detecção de genes de EE bem como o envolvimento de Estafilococos coagulase negativa em surtos e casos de intoxicação alimentar é bastante reduzido em relação aos casos envolvendo Estafilococos coagulase positiva, entretanto, alguns deles são descritos na literatura (CARMO et al., 2002). Segundo Jay (2002), a produção de enterotoxinas geralmente está relacionada com cepas de estafilococos que produzem as enzimas coagulase e

termonuclease, embora algumas cepas que não produzem coagulase e/ou termonuclease possam produzir enterotoxinas. Lancette e Bennett (2001) afirmam que existe uma instabilidade fisiológica demonstrada por algumas espécies do gênero *Staphylococcus* em função de fatores genéticos e ambientais, e que estes fatores podem afetar a produção dessas enzimas e das EE.

3.4 Queijo Minas Frescal

Alimentos, tanto de origem animal quanto vegetal, podem ser veículos de *S. aureus* e de suas enterotoxinas (ATANASSOVA, MEINDL e RING, 2001; LANCETTE e BENNETT, 2001; FRANCO e LANDGRAF, 2002), no entanto, leite e derivados lácteos, como leite cru, leite pasteurizado, leite tratado por ultra alta temperatura (UHT) e queijos, são os alimentos mais envolvidos em casos e/ou surtos de intoxicação alimentar estafilocócica (CENCI-GOGA et al., 2003; FUEYO, MENDOZA e MARTÍN, 2005). Considerando que os derivados lácteos são os principais alimentos veiculadores de patógenos, em especial *S. aureus*, e o importante papel representado pelo leite na alimentação humana, LISITA (2005) caracteriza o leite produzido no Brasil como de qualidade insatisfatória e afirma que este é um problema crônico, de difícil solução, uma vez que fatores de ordem social, econômica e cultural estão envolvidos em sua produção. A respeito disso, ressalta-se que um leite de má qualidade, associado às péssimas condições de fabricação de queijos, notadamente os artesanais, e a falta ou ineficiência do sistema de refrigeração ao longo da cadeia produtiva, agravam a situação e criam condições de contaminação e desenvolvimento de microrganismos em diferentes pontos na cadeia produtiva de queijos.

O queijo Minas Frescal é um alimento de grande aceitação, muito apreciado e consumido no Brasil. Segundo o Regulamento Técnico Para Fixação de Identidade e Qualidade do Queijo Minas Frescal (BRASIL, 1997), entende-se por queijo Minas Frescal, o queijo fresco, obtido pela coagulação enzimática do leite com coalho e/ou outras enzimas coagulantes apropriadas, e que está pronto para o consumo pouco tempo após sua preparação. É classificado como semi gordo, com conteúdo de gordura entre 25% e 44,9%, de umidade $\geq 55\%$ (BRASIL, 1997; BRASIL, 2004), não maturado,

que deve ser consumido em até 35 dias após sua fabricação, sendo, portanto, um alimento altamente perecível. O leite, após a pasteurização, não apresenta uma microbiota dominante, ou seja, se o queijo que é preparado com esse leite não é manipulado com Boas Práticas de Fabricação (BPF), *S. aureus* pode contaminar o alimento, onde, então, pode encontrar um ambiente favorável para sua multiplicação. De acordo com os padrões microbiológicos vigentes (Resolução da Diretoria Colegiada 12, ANVISA, BRASIL, 2001), o queijo Minas Frescal elaborado por coagulação enzimática e sem ação de bactérias lácticas, deve apresentar, no máximo, para amostra representativa, 500 UFC (unidades formadoras de colônias) de *Estafilococos* coagulase positiva por grama de alimento. Embora a legislação nacional tolere um limite de *Estafilococos* coagulase positiva nesse tipo de queijo, não é incomum encontrar na literatura, relatos de trabalhos com esse alimento, em que o produto encontrava-se em desacordo com o padrão legal vigente (FREITAS, 2005; ALMEIDA, 2006).

4 ARTIGO 1: Comparação entre Dois Métodos para Extração de DNA de *Staphylococcus aureus* em Queijo Minas Frescal

COMPARAÇÃO ENTRE DOIS MÉTODOS PARA EXTRAÇÃO DE DNA DE *Staphylococcus aureus* EM QUEIJO MINAS FRESCAL

ZOCHE, Fernando¹; BASTOS Caroline Peixoto²; FRANÇA, Rodrigo Correa³;
SILVA, Wladimir Padilha da⁴

RESUMO

O objetivo deste estudo foi comparar dois métodos para extração de DNA de *Staphylococcus aureus* artificialmente inoculado em queijo Minas Frescal, confirmando a qualidade do DNA extraído através de PCR para os genes de enterotoxinas estafilocócicas (EE). Para tanto, adaptou-se dois métodos descritos na literatura, denominando-os de método A e método B. O método A é baseado na remoção de componentes da matriz alimentar, tais como gordura e proteínas, através de solventes orgânicos, enquanto o método B, baseia-se na utilização de centrifugação e proteinase K para remoção da gordura e proteínas, respectivamente. Após extração do DNA pelos dois métodos, realizou-se PCR para amplificar fragmentos de genes de EE. Com o DNA obtido pelo método A, foi possível amplificar fragmentos dos genes *sea*, codificador da enterotoxina estafilocócica A (EEA), *seb* (EEB), *sec* (EEC), *sed* (EED), *see* (EEE), *sei* (EEI) e *selj* (EELJ), quando *S. aureus* encontrava-se numa concentração $\geq 10^6$ UFC.g⁻¹ de queijo. Já com o DNA obtido a partir do método B foi possível amplificar fragmentos dos genes *sea* (EEA), *sed* (EED), *sei* (EEI) e *selj* (EELJ) em concentrações de até 10^2 UFC.g⁻¹ de queijo e dos genes *seb*, (EEB), *sec* (EEC), *see* (EEE) e *seg* (EEG) em concentrações $\geq 10^3$ UFC.g⁻¹. *S. aureus* produz EE suficiente para causar intoxicação alimentar estafilocócica somente quando atinge concentração celular de, aproximadamente, 10^5 UFC.g⁻¹ de alimento, ou seja, com o DNA obtido pelo método B foi

¹ Médico Veterinário (MV), M.Sc., Doutorando do Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial - Laboratório de Microbiologia de Alimentos – DCTA - FAEM – UFPel. campus universitário s/n – caixa postal 354 – 96010000 – Pelotas – RS, Brasil. Telefone: 55(53)32757378 ramal 202. Email: fernandozocche@hotmail.com

² Química de Alimentos, do Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial - Laboratório de Microbiologia de Alimentos – DCTA - FAEM – UFPel. campus universitário s/n – caixa postal 354 – 96010000 – Pelotas – RS, Brasil. Telefone: 55(53)32757378 ramal 202. Email: carolpebastos@yahoo.com.br

³ Aluno do Curso de Medicina Veterinária – Laboratório de Microbiologia de Alimentos - DCTA - FAEM – UFPel – Bolsista FAPERGS. campus universitário s/n – caixa postal 354 – 96010000 – Pelotas – RS, Brasil. Telefone: 55(53)32757378 ramal 202. Email: rodrigodfranca@yahoo.com.br

⁴ MV, Professor, Dr, Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial – Laboratório de Microbiologia de Alimentos - DCTA - FAEM – UFPel. campus universitário s/n – caixa postal 354 – 96010000 – Pelotas – RS, Brasil. Telefone: 55(53)32757378 ramal 203. Email: silvawp@ufpel.edu.br

possível detectar *S. aureus* enterotoxigênicos em queijo Minas Frescal antes desse microrganismo alcançar níveis potencialmente perigosos para a saúde humana. O método B foi mais eficiente que o método A, possibilitando amplificação de genes de EE em concentrações de *S. aureus* de até 10^2 UFC.g⁻¹ de queijo.

PALAVRAS-CHAVE: PCR, enterotoxinas estafilocócicas, alimentos.

SUMMARY

Comparison between two methods for *Staphylococcus aureus* DNA extraction in Minas Frescal Cheese

The aim of this study was to compare two methods for DNA extraction from *Staphylococcus aureus* in artificially contaminated Minas Frescal Cheese, confirming the quality of the DNA extracted by PCR for staphylococcal enterotoxin genes (EE). In order, it has adapted two methods described in the literature, called them of method A and method B. The method A is based on the removal of matrix components of the food, as well as lipids and proteins through organics solvents, whereas the method B is based on using of centrifugation and proteinase K for removal of lipids and protein, respectively. After the DNA extraction by the two methods, PCR was achieved to amplify fragments of the EE genes. With the DNA obtained by method A was possible to amplify fragments of the *sea* gene, staphylococcal enterotoxin A encoder (SEA), *seb* (SEB), *sec* (SEC), *sed* (SED), *see* (SEE), *sei* (SEI) and *selj* (SELJ), when *S. aureus* was in a concentration $\geq 10^6$ UFC.g⁻¹ of cheese. On the other hand, with the DNA obtained by method B was possible to amplify fragments of *sea* gene (SEA), *sed* (SED), *sei* (SEI) and *selj* (SELJ) in concentration up to 10^2 UFC.g⁻¹ of cheese and the *seb* gene (SEB), *sec* (SEC), *see* (SEE) and *seg* (SEG) in concentration $\geq 10^3$ UFC.g⁻¹. *S. aureus* produces EE enough to causing staphylococcal food poisoning only when it reaches cell concentration of approximately 10^5 UFC.g⁻¹ of food, that is with the DNA obtained by method B has been possible to detect enterotoxigenic *S. aureus* in Minas Frescal Cheese before this microorganism reaches levels potentially dangerous for the human health. The method B was more efficient than method A, enabling amplification of the EE genes in concentration of *S. aureus* up to 10^2 UFC.g⁻¹ of cheese.

Keywords: PCR, staphylococcal enterotoxinas, food.

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Staphylococcus* é formado por 41 espécies e 24 subespécies (EUZÉBY, 2008). Entre as bactérias desse gênero, *Staphylococcus aureus* é a mais relacionada a casos e a surtos de intoxicação alimentar devido à sua capacidade de produzir enterotoxinas (EE) (CHEN *et al.*, 2004; SILVA *et al.*, 2005; NEMA *et al.*, 2007). *S. aureus* é um dos principais agentes da mastite bovina (ZSCHÖCK *et al.*, 2005), dessa forma, freqüentemente contamina o leite e derivados lácteos, os quais são os alimentos mais envolvidos em casos e/ou surtos de intoxicação alimentar estafilocócica (CENCI-GOGA *et al.*, 2003; FUEYO *et al.*, 2005; KÉROUANTON, *et al.*, 2007).

Dentre os derivados lácteos de maior risco para essa intoxicação, destaca-se o queijo do Minas Frescal, que é um alimento tradicional, muito apreciado e consumido no Brasil (PERRY, 2004). Por ser semi-gordo e de muito alta umidade, suas características podem favorecer a multiplicação de *S. aureus*, com conseqüente produção de EE.

A avaliação da presença de *Staphylococcus* em queijo é usualmente realizada através de semeadura em meios de cultura seletivo-diferencial, seguida de testes adicionais, tais como coagulase, catalase e termonuclease (LANCETTE & BENNETT, 2001). No entanto, os métodos convencionais não diferenciam *S. aureus* de outras espécies de *Staphylococcus* capazes de produzir EE, são laboriosos e exigem elevado tempo necessário para o diagnóstico.

A identificação de microrganismos patogênicos em alimentos sofreu significativos avanços nos últimos anos com o desenvolvimento de técnicas moleculares de diagnóstico, as quais surgiram como alternativa àquelas tradicionalmente usadas para isolamento e identificação microbiana em alimentos. Na última década, diversos trabalhos reportaram o uso da amplificação *in vitro* do DNA pela reação em cadeia da polimerase (PCR), para detecção de patógenos, como *S. aureus*, em alimentos (BLAIOTTA *et al.*, 2004; CHEN *et al.*, 2004; KWON *et al.*, 2004). Através dessa técnica é possível a obtenção de resultados rápidos, específicos e sensíveis, quando comparados com aqueles produzidos com métodos tradicionalmente utilizados para a diferenciação e identificação desse microrganismo, no entanto, a eficiência das técnicas moleculares está intimamente relacionada com a qualidade da extração de ácidos nucléicos. Lipídios, proteínas e outros componentes presentes na matriz alimentar podem desfavorecer a amplificação do DNA, comprometendo a PCR (CREMONESI *et al.*, 2006).

Diversas técnicas foram descritas na literatura objetivando extrair DNA de microrganismos diretamente em leite e derivados (DRAKE *et al.*, 1996; TAMARAPU *et al.*, 2001; MEIRI-BENDEK *et al.*, 2002; RAMESH *et al.*, 2002; NAKAYAMA *et al.*, 2006; BONAÏTI *et al.*, 2006; CREMONESI *et al.*, 2006; PARAYRE *et al.*, 2007), as quais utilizam, geralmente, uma etapa de lise celular através de enzimas, e/ou uma quebra mecânica da parede celular microbiana associada a solventes orgânicos para remoção de gorduras e proteínas. No entanto, essas técnicas exigem múltiplos reagentes e etapas para separação e purificação do DNA, assim como, em alguns casos, a utilização de equipamentos especializados, o que inviabiliza o emprego em larga escala. Além disso, alguns autores reportam o uso de “kits” para purificação de DNA após a lise celular, aumentando significativamente os custos da análise (LETERTRE *et al.*, 2003; NAKAYAMA *et al.*, 2006).

O objetivo deste estudo foi comparar dois métodos para extração de DNA de *S. aureus* diretamente de queijo Minas Frescal experimentalmente inoculados, comprovando a qualidade do DNA extraído por PCR para amplificação de fragmentos de genes de EE.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Cepas bacterianas

As cepas de referência utilizadas para a inoculação das amostras de queijo estão listadas na Tabela 1.

TABELA 1: Cepas de referência utilizadas na padronização das extrações de DNA e PCR, com os respectivos genes avaliados.

Cepas	Genes de enterotoxinas	Referência
<i>S. aureus</i> FRI* S6	<i>sea, seb</i>	PARAYRE <i>et al.</i> (2007)
<i>S. aureus</i> FRI* 361	<i>sec, sed, seg, sei, selj</i>	KWON <i>et al.</i> (2004) OMOE <i>et al.</i> (2005)
<i>S. aureus</i> FRI* 326	<i>see</i>	NAKAYAMA <i>et al.</i> (2006)

* FRI – Food Research Institute

As cepas foram inoculadas individualmente em caldo Infusão de Cérebro e Coração (BHI - Acumedia[®]) e incubadas à 37°C por 18-24 horas. A determinação da concentração celular

presente em BHI foi realizada por semeadura *pour plate* em ágar Padrão para Contagem (PCA - Acumedia®). Após, 1mL de cada cultivo de *S. aureus* em BHI foi repassado para o mesmo tubo de ensaio, totalizando 3mL. A concentração celular foi ajustada com solução salina 0,85% realizando-se diluições decimais seriadas, até a obtenção de 10^7 à 10^2 UFC mL⁻¹.

2.2 Contaminação artificial do queijo Minas Frescal

A matriz alimentar utilizada neste estudo foi adquirida no comércio local de Pelotas, RS, e submetida a avaliação tradicional de *Staphylococcus aureus* (LANCETTE & BENNETT, 2001) para confirmar a ausência de células viáveis desse microrganismo. Após, alíquotas de queijo (10g) foram inoculadas com 10mL de solução salina 0,85% contendo um “mix” das cepas padrão de *S. aureus* (Tabela 1), em concentrações variando entre 10^7 e 10^2 UFC mL⁻¹, obtendo-se assim, um queijo contaminado com concentrações bacterianas variando entre 10^7 e 10^2 UFC g⁻¹.

2.3 Extração do DNA

Para extração do DNA de *S. aureus* diretamente do alimento foram utilizados dois métodos:

2.3.1 Método A

Utilizou-se o procedimento descrito por TAMARAPU *et al.* (2001), com modificações. Inicialmente, 10g do queijo artificialmente contaminado foram homogeneizadas com 45mL de uma solução de citrato de sódio 2% e 10mL dessa solução foram utilizados como unidade analítica. A essa unidade analítica, adicionou-se 2mL de etanol absoluto, 2mL de hidróxido de amônia e 2mL de éter de petróleo, com posterior homogeneização. Centrifugou-se, então, a mistura à 12000 x *g* durante 10 minutos. Descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o “pellet” em 300µL de tampão Tris-EDTA (pH 7,8). A esse volume adicionou-se 100µL de lisostafina (100µg.mL⁻¹, Sigma®) e incubou-se em banho-maria à 37°C durante 45 minutos, com vigorosa homogeneização em vórtex. Para auxiliar a lise celular, adicionou-se 50µL de dodecil sulfato de sódio (SDS) 20% e incubou-se em banho maria em ebulição durante 5 minutos.

Adicionou-se, então, 360µL de uma solução fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) com suave homogeneização por inversão do tubo. Após centrifugação a 16100 x *g* durante 13 minutos, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e o DNA foi precipitado com 800µL de etanol absoluto gelado, permanecendo no tubo à -20°C por, no mínimo, 2 horas. Centrifugou-se a mistura a 16100 x *g* durante 40 minutos à 4°C, descartou-se o sobrenadante, lavou-se o *pellet* com etanol 70% e, após centrifugação a 16100 x *g* por 3 minutos à 4°C, ressuspendeu-se o *pellet* de DNA em 30µL de água ultrapura estéril.

A integridade e a quantidade de DNA extraído foram estimadas por eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídeo em comparação com o padrão de massa molecular DNAλ/*Hind*III (Invitrogen®).

2.3.2 Método B

Adaptaram-se os protocolos propostos por TAMARAPU *et al.* (2001) e por PARAYRE *et al.* (2007). Inicialmente, 10g do queijo artificialmente contaminado foram homogeneizados com 45mL de uma solução de citrato de sódio 2% e 10mL dessa diluição foram utilizados como unidade analítica. Após aquecimento à 50°C por 10 minutos, centrifugou-se a unidade analítica a 10000 x *g* durante 10 minutos em temperatura ambiente e, após a retirada do sobrenadante, ressuspendeu-se o *pellet* em 400µL de tampão de lise contendo 50mM de tris-HCl adicionado de 10mM de EDTA e 5% de SDS. A este conteúdo adicionou-se 100µL de lisostafina (100µg.mL⁻¹, Sigma®) e 20µL de proteinase K (20mg.mL⁻¹) com posterior incubação em banho-maria à 37°C durante 1 hora. Após, adicionou-se igual volume de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) e homogeneizou-se o conteúdo suavemente por inversão do tubo. Posteriormente, centrifugou-se a 16100 x *g* durante 13 minutos, transferiu-se o sobrenadante para um novo tubo, e o DNA foi precipitado com 800µL de etanol absoluto gelado, permanecendo à -20°C por, no mínimo, 2 horas. Após, centrifugou-se a 16100 x *g* durante 40 minutos à 4°C, descartou-se o sobrenadante, lavou-se o *pellet* com etanol 70% e, após nova centrifugação durante 16100 x *g* por 3 minutos à 4°C, ressuspendeu-se o *pellet* de DNA em 30µL de água ultra pura estéril.

A integridade e a quantidade de DNA extraído foram estimadas por eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídeo em comparação com o padrão de massa molecular DNAλ/*Hind*III (Invitrogen®).

Os dois métodos testados foram repetidos pelo menos 10 vezes, utilizando-se amostras de queijos diferentes e extrações em dias diferentes.

2.4 Oligonucleotídeos iniciadores

Para a detecção dos genes das enterotoxinas foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores descritos na Tabela 2.

TABELA 2: Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a amplificação de fragmentos dos genes de enterotoxinas estafilocócicas.

Descrição	Seqüência 5' → 3'	Número de acesso ¹	Posição no gene	Fragmento estimado (pb)	Referência
<i>Universal forward primer</i>	TGTATGTATGGAGGTGTAAC	-	-	-	Sharma <i>et al.</i> (2000)
<i>Second universal forward primer</i>	TACATGTATGGAGGTGCCAC	-	-	-	Kwon <i>et al.</i> (2004)
<i>Reverse primer for sea</i>	TTGAACACTGTCCTTGAGC	M18970	691– 673	304	Kwon <i>et al.</i> (2004)
<i>Reverse primer for seb</i>	ATAGTGACGAGTAAGGTA	M11118	825– 808	165	Sharma <i>et al.</i> (2000)
<i>Reverse primer for sec</i>	TTGTAAGGTGGACTTCTATC	X05815	904– 885	379	Kwon <i>et al.</i> (2004)
<i>Reverse primer for sed</i>	GGCTTTAGTGTCTAATGT	M28521	2003–1086	422	Kwon <i>et al.</i> (2004)
<i>Reverse primer for see</i>	GCCAAACCTGTCTGAG	M21319	600– 585	213	Sharma <i>et al.</i> (2000)
<i>Reverse primer for seg</i>	AAGTCATTGTCTATTGTCG	AF064773	642– 624	93	Kwon <i>et al.</i> (2004)
<i>Reverse primer for sei</i>	GCAGTCCATGTCCTGTATAA	AF064774	787– 768	334	Kwon <i>et al.</i> (2004)
<i>Reverse primer for selj</i>	AGTTCACCTGACTTCAACG	AF053140	1828- 1809	531	Kwon <i>et al.</i> (2004)
<i>SEC1</i>	GACATAAAAGCTAGGAATTT	AB08425	676-695	257	Nájera-Sanchez <i>et al.</i> (2003)
<i>SEC2</i>	AAATCGGATTAACATTATCCA	6	912-932		

1 – Número de acesso do gene no GenBank (NCBI, 2008).

2.5 Reação em cadeia da polimerase

Inicialmente, estabeleceram-se as melhores condições para a PCR, testando-se temperaturas de anelamento variando entre 44°C e 55°C para todos os oligonucleotídeos iniciadores e todas as concentrações de DNA obtidas.

Padronizou-se PCR uniplex para cada gene de EE e, em cada reação, foram adicionados dois *primers forward* com oligonucleotídeos iniciadores reversos individuais para cada gene avaliado (Tabela 2), segundo estratégia proposta por KWON *et al.* (2004). Cada reação consistiu de 10pmol de cada oligonucleotídeo iniciador, 0,1mM de dNTP mix, 4mM de cloreto de magnésio, solução tampão para PCR contendo 1,25mM de KCl e 0,5mM de Tris-HCl (pH 8,4), 1,5U de *Taq* DNA polimerase, e água ultra pura esterilizada, totalizando um volume de 25µL por tubo. Quantidades entre 10 e 100ng de DNA extraído foram utilizadas como molde para a PCR.

Para o gene *sec*, inicialmente, utilizou-se o *universal forward primer* e o *reverse primer for sec*, no entanto, devido a ausência de amplificação desse gene em concentrações de *S. aureus* inferiores a 10^6 UFC.g⁻¹, adotou-se os *primers* SEC1 e 2, os quais foram utilizados numa concentração de 10pmol em um mix de reagentes igual ao dos demais genes alvo.

A amplificação dos fragmentos foi realizada em termociclador (MJ Research, PTC – 100, Peltier Thermal Cycler), através de desnaturação inicial do DNA à 95°C por 5 minutos, seguida de 32 ciclos (95°C – 45 segundos, 51°C – 45 segundos e 72°C – 45 segundos), e de extensão final à 72°C por 10 minutos. Para amplificação do fragmento do gene *sec* com os *primers* SEC1 e 2, utilizou-se desnaturação inicial do DNA à 95°C por 5 minutos, seguida de 32 ciclos (95°C – 1 minuto, 44,5°C – 1 minuto e 72°C – 1 minuto), e de extensão final à 72°C por 10 minutos. Os produtos de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose contendo brometo de etídeo, e visualizados sob iluminação ultra-violeta. O marcador de massa molecular utilizado foi o 100pb DNA Ladder (BioLabs®).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo objetivou-se comparar, através de amplificação por PCR, a qualidade do DNA de *S. aureus* extraído diretamente de queijo Minas Frescal, por dois métodos diferentes. Foi possível extrair DNA diretamente de queijo, através dos métodos A e B, a partir de concentração de inoculação de 10^2 UFC.g⁻¹. Os produtos das extrações obtidos através dos métodos A e B estão apresentados na Figura 1.

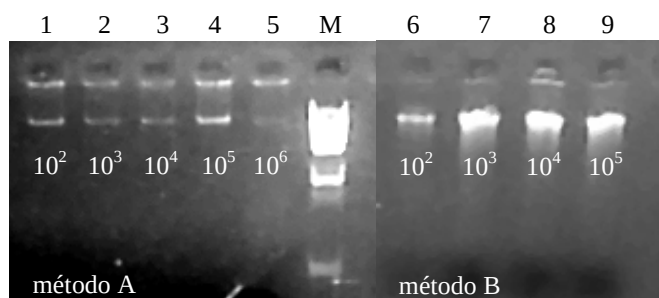


FIGURA 1: Eletroforese em gel de agarose 1%, de DNA extraído de *S. aureus* artificialmente inoculado em queijo Minas Frescal. Colunas 1 à 5: DNA extraído utilizando-se o método A e com concentrações de *S. aureus* variando de 10^2 UFC.g⁻¹ a 10^6 UFC.g⁻¹ de queijo. Colunas 6 a 9: DNA extraído utilizando-se o método B e com concentrações de *S. aureus* variando de 10^2 UFC.g⁻¹ a 10^5 UFC.g⁻¹ de queijo. Coluna M – Marcador de massa molecular DNA/*Hind*III (INVITROGEN®).

Diversos trabalhos reportam diferentes estratégias para extração de DNA genômico de patógenos bacterianos em produtos lácteos (TAMARAPU *et al.*, 2001; RAMESH *et al.*, 2002; BONAĬTI *et al.*, 2006; CREMONESI *et al.*, 2006; PARAYRE *et al.*, 2007). Neste estudo, em ambos os métodos de extração, se utilizou lisostafina para auxiliar no rompimento da parede celular de *S. aureus*, estratégia semelhante à adotada por TAMARAPU *et al.* (2001) e PARAYRE *et al.* (2007), os quais descrevem o uso de enzimas (lisostafina e lisozima, respectivamente) para lise celular de bactérias Gram positivas presentes em lácteos. Um protocolo diferente foi reportado por BONAĬTI *et al.* (2006), os quais usaram esferas metálicas para rompimento mecânico da parede celular, obtendo, também, um DNA de qualidade adequada para PCR.

Neste estudo, empregou-se hidróxido de amônio no método A e proteinase K no método B para a degradação da proteína do queijo, estratégias semelhantes às reportadas por RAMESH *et al.* (2002) e por PARAYRE *et al.* (2007), os quais utilizaram uréia para a dissolução de proteínas do leite e proteinase K na digestão de proteínas de queijo, respectivamente.

TAMARAPU *et al.* (2001), assim como RAMESH *et al.* (2002), utilizaram éter como solvente para dissolver a gordura de derivados lácteos, e obtiveram DNA adequado para amplificação de fragmentos do gene *nuc* de *S. aureus*. NAKAYAMA *et al.* (2006) também descreveram o uso de solventes orgânicos para extração de DNA de *S. aureus* em leite e, através da PCR padronizada por esses autores, foi possível amplificar fragmentos de genes de EE de *S. aureus* em concentrações de até 10^2 UFC.mL⁻¹ de leite. Neste estudo, quando se utilizou éter como solvente orgânico (método A) obteve-se baixa sensibilidade na PCR, pois, embora tenha

sido possível extrair DNA em concentrações celulares inferiores a 10^6UFC.g^{-1} de queijo (Fig. 1), não houve amplificação dos genes de EE abaixo desse limite.

As amplificações de fragmentos de genes de EE utilizando-se DNA de *S. aureus* extraído através do método A, podem ser visualizados na Figura 2.

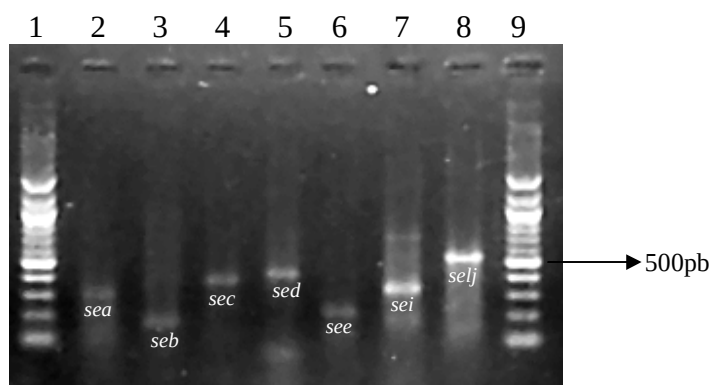


FIGURA 2: Eletroforese em gel de agarose 1,5% de produtos de PCR realizada com o DNA de *S. aureus* obtido a partir do método A, numa concentração de 10^6UFC.g^{-1} , utilizando 51°C como temperatura de anelamento de *primers*. Colunas 1 e 9 – marcador de massa molecular Ladder 100 pb (BIOLABS®). Coluna 2: fragmento de *sea* (304pb); Coluna 3: fragmento de *seb* (165pb); Coluna 4: fragmento de *sec* (379pb); Coluna 5: fragmento de *sed* (422pb); Coluna 6: fragmento de *see* (213pb); Coluna 7: fragmento de *sei* (334pb); Coluna 8: fragmento de *selj* (531pb).

A não amplificação de fragmentos de genes de EE utilizando-se o DNA extraído através do método A, quando *S. aureus* encontrava-se em concentrações inferiores a 10^6UFC.g^{-1} , pode estar relacionada a resíduos de solvente que podem ter permanecido após a extração e prejudicaram a reação.

BONAÏTI *et al.* (2006) reportam que existe forte adesão de *S. aureus* nos componentes do queijo, o que diminui a eficiência da recuperação do DNA bacteriano, havendo perda do ácido nucléico ao longo da extração, o que pode explicar a baixa sensibilidade da PCR quando se utilizou DNA de *S. aureus* extraído pelo método A. Além disso, durante o procedimento de extração, podem permanecer junto ao DNA, substâncias que diminuem a eficiência da PCR (NAKANO *et al.*, 2004; CREMONESI *et al.*, 2006). Dessa forma, inibidores residuais da matriz alimentar, tais como íons Ca^{+2} , proteinases, gordura e proteínas do queijo podem ter impedido o acesso da polimerase ao DNA de *S. aureus*, diminuindo a sensibilidade da reação.

Com o DNA obtido pelo método B foi possível amplificar fragmentos dos genes *sea*, *sed*, *sei* e *selj*, quando *S. aureus* estava presente numa concentração $\geq 10^2 \text{UFC.g}^{-1}$ de queijo, enquanto fragmentos dos genes *seb*, *sec*, *see* e *seg* só foram amplificados quando *S. aureus*

encontrava-se numa concentração $\geq 10^3 \text{UFC.g}^{-1}$. Dessa forma, comparando os dois métodos de extração, o uso de centrifugação para remoção da gordura, e de proteinase K para a remoção de proteínas, permitiu a obtenção de DNA mais adequado para uso na PCR proposta. Os produtos de PCR obtidos a partir do DNA extraído pelo método B podem ser visualizados na Figura 3.

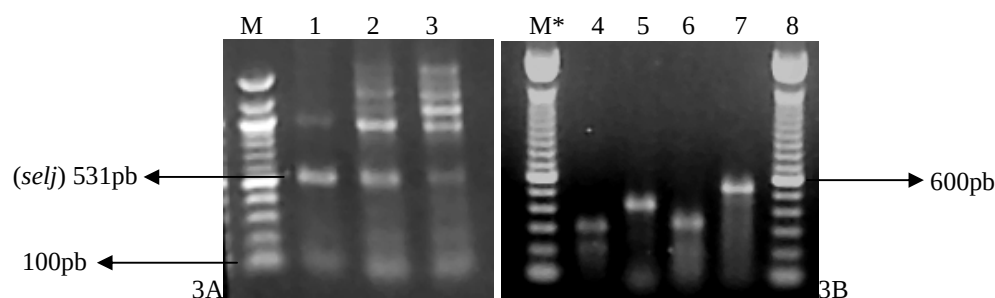


FIGURA 3: Eletroforese em gel de agarose 1% de produtos de PCR realizada com DNA obtido pelo método B, utilizando 51°C como temperatura de anelamento de *primers*. 3A – Coluna M – marcador de massa molecular Ladder 100pb (BIOLABS®); Coluna 1: fragmento de *selj* (531pb) obtido a partir de DNA de *S. aureus* em queijo Minas Frescal inoculado com 10^4UFC.g^{-1} . Coluna 2: fragmento de *selj* (531pb) obtido a partir de DNA de *S. aureus* em queijo Minas Frescal inoculado com 10^3UFC.g^{-1} . Coluna 3: fragmento de *selj* (531pb) obtido a partir de DNA de *S. aureus* em queijo Minas Frescal inoculado com 10^2UFC.g^{-1} . 3B - Eletroforese de produtos de PCR realizada com DNA de *S. aureus* obtido pelo método B, em queijo inoculado com 10^2UFC.g^{-1} , utilizando 51°C como temperatura de anelamento de *primers*. Coluna 4: fragmento de *sea* (304pb); Coluna 5: fragmento de *sed* (422pb); Coluna 6: fragmento de *sei* (334pb); Coluna 7: fragmento de *selj* (531pb); Coluna M* – marcador de massa molecular Ladder 100 pb (INVITROGEN®).

Outro aspecto que deve ser ressaltado com relação ao desempenho dos dois métodos testados é que com o DNA extraído pelo método A não foi possível amplificar o gene *seg*, diferente do método B, no qual houve amplificação desse gene quando *S. aureus* encontrava-se numa concentração $\geq 10^3 \text{UFC.g}^{-1}$ de queijo.

É possível observar na Figura 3A que quanto menor a concentração de DNA de *S. aureus*, mais intensa foi a presença e amplificação de fragmentos inespecíficos, o que pode ser atribuído a uma maior competição pelos reagentes, desfavorecendo a amplificação de fragmentos de genes de EE. Ressalta-se que os fragmentos inespecíficos somente foram gerados nas reações propostas para amplificação de *see* e *selj*, e que a presença desses fragmentos não prejudicou a amplificação e visualização dos produtos esperados.

Com relação a amplificações não específicas, HWANG *et al.* (2007) relatam que a obtenção de *primers* adequados para amplificar fragmentos de genes de EE, com alta especificidade e sem reações cruzadas, não é uma tarefa fácil, devido à alta similaridade genética existente entre esses genes (JARRAUD *et al.*, 2001). Neste estudo, a estratégia de utilização de

dois *primers forward*, associados com *primers* reversos individuais para cada EE, associado a pequena disponibilidade de DNA empregada na PCR para amplificação de *see* e *selj*, pode ter favorecido a ocorrência desses fragmentos inespecíficos, o que também foi relatado por KWON *et al.* (2004), os quais, utilizando o mesmo *universal primer forward* deste estudo, também observaram um fragmento inespecífico durante a amplificação do gene *seh* (EEH) de *S. aureus*. Ainda com relação aos *primers*, quando se utilizou *universal forward primer* e *reverse primer for sec* para amplificar o gene *sec*, obteve-se sucesso apenas quando se empregou o DNA obtido pelo método A e quando *S. aureus* encontrava-se numa concentração $\geq 10^6 \text{UFC.g}^{-1}$ (Figura 2). Por outro lado, o uso dos *primers* SEC1 e 2 permitiu amplificar fragmento do gene alvo quando *S. aureus* encontrava-se numa concentração $\geq 10^3 \text{UFC.g}^{-1}$ de queijo, utilizando-se DNA extraído pelo método B.

TAMARAPU *et al.* (2001), amplificaram fragmento do gene *nuc* de *S. aureus* a partir de DNA extraído diretamente de queijo cheddar numa concentração microbiana de 10UFC.g^{-1} . Entretanto, considerando o limite de detecção obtido com o DNA extraído pelo método B (10^2UFC.g^{-1}) e que *S. aureus* somente produz EE suficientes para causar intoxicação alimentar estafilocócica quando alcança concentrações celulares de, aproximadamente, 10^5UFC.g^{-1} , os resultados deste estudo demonstram que com o DNA extraído pelo método B, baseado em centrifugação e proteinase K para remoção da gordura e proteínas, respectivamente, é possível diagnosticar *S. aureus* potencialmente enterotoxigênicos em queijo Minas Frescal abaixo do limite estabelecido pela legislação nacional para este alimento ($5 \times 10^2 \text{UFC.g}^{-1}$) e antes desse microrganismo alcançar níveis celulares capazes de produzir toxinas nos alimentos em quantidade suficiente para causar a doença em humanos.

4. CONCLUSÃO

O método B de extração de DNA de *S. aureus* diretamente em queijo Minas Frescal foi mais eficiente que método A, permitindo amplificação de genes de EE em concentrações microbianas de até 10^2UFC.g^{-1} de queijo.

5. AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, processo 478100/04-3, pelo suporte financeiro.

6. REFERÊNCIAS

- (1) EUZÉBY, J. P. List of Bacterial names with Standing in Nomenclature. Disponível em: <http://www.bacterio.cict.fr/s/staphylococcus.html>>. Acesso em: 23 mar. 2008.
- (2) CHEN, T.R., CHIOU, C.S., TSEN, H.Y. Use of novel PCR *primers* specific to the genes of staphylococcal enterotoxin G, H, I for the survey of *Staphylococcus aureus* strains isolated from food-poisoning cases and food samples in Taiwan. **International Journal of Food Microbiology**, v. 92, p. 189– 197, 2004.
- (3) SILVA, E. R.; CARMO, L. S.; SILVA, N. Detection of the enterotoxins A, B and C genes in *Staphylococcus aureus* from goat and bovine mastitis in Brazilian dairy herds. **Veterinary Microbiology**, v. 106, p. 103-107, 2005.
- (4) NEMA, V.; AGRAWAL, R.; KAMBOJ, D.V.; GOEL, A.K.; SINGH, L. Isolation and characterization of heat resistant enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* from a food poisoning outbreak in Indian subcontinent. **International Journal of Food Microbiology**, v. 117, p. 29 – 35, 2007.
- (5) ZSCHÖCK, M.; BÄRBEL, K.; WOLTER, W.; HAMMAN, H. P.; LÄMMLER, C. Pattern of enterotoxin genes *seg*, *seh*, *sei* and *sej* positive *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. **Veterinary Microbiology**, v. 108, p. 243-249, 2005.
- (6) CENCI-GOGA, B.T., KARAMA, M., ROSSITTO, P.V., MORGANTE, R.A., CULLOR, J.S. Enterotoxin production by *Staphylococcus aureus* isolated from mastitic cows. **Journal of Food Protection**, v. 66, p.1693-1696, 2003.
- (7) FUEYO, J. M.; MENDOZA, M. C.; MARTÍN, M. C. Enterotoxins and toxic shock syndrome toxin in *Staphylococcus aureus* recovered from human nasal carriers and manually handled foods: epidemiological and genetic findings. **Microbes and Infection**, Paris, v.7, p.187-194, 2005.
- (8) KÉROUANTON A.; HENNEKINNE, J.A.; LETERTRE, C.; PETIT L.; CHESNEAU O.; BRISABOIS, A.; DE BUYSER, M.L. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains associated with food poisoning outbreaks in France. **International Journal of Food Microbiology**, v. 115, p. 369– 375, 2007.
- (9) PERRY, K.S.P. Queijos: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. **Química Nova**, v.27. p.293-300, 2004.

- (10) LANCETTE, G.A.; BENNETT, R.W. *Staphylococcus aureus* and Staphylococcal Enterotoxins. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4.ed. American Public Health Association (APHA), p. 387-400, 2001.
- (11) BLAIOTTA, G.; ERCOLINI, D.; PENNACCHIA, C.; FUSCO, V.; CASABURI, A.; PEPE, O.; VILLANI, F. PCR detection of staphylococcal enterotoxin genes in *Staphylococcus* spp. strains isolated from meat and dairy products. Evidence for new variants of seG and seI in *S. aureus* AB-8802. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, p. 719-730, 2004.
- (12) KWON, N.H.; KIM, S.H.; PARK, K.T.; BAE, W.K.; KIM, J.Y.; LIM, J.Y.; AHN, J.S.; LYOO, K.S.; KIM, J.M.; JUNG, W.K.; NOH, K.M.; BOHACH, G.A.; PARK, Y.H. Application of extended single-reaction multiplex polymerase chain reaction for toxin typing of *Staphylococcus aureus* isolates in South Korea. **International Journal of Food Microbiology**, v.97. p. 137-145, 2004.
- (13) CREMONESI, P., CASTIGLIONI, B., Malferrari, G., BIUNNO, I., VIRMECATI, C., MORONI, P., MORANDI, S., LUZZANA, M. Technical note: Improved method for rapid DNA extraction of mastitis pathogens directly from milk. **Journal of Dairy Science**, v. 89, p. 163-169, 2006.
- (14) DRAKE, M.A., SMALL, C.L., SPENCE, K.D., SWANSON, B.G. Rapid detection and identification of *Lactobacillus* spp. in dairy products by using the polymerase chain reaction. **Journal of Food Protection**, v. 59, p.1031-1036, 1996.
- (15) 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. p. 664-668, 2001.
- (16) MEIRI-BENDEK, I., LIPKIN, E., FRIEDMANN, A., LEITNER, G., SARAN, A., FRIEDMANN, S., KASHI, Y. A PCR-based method for the detection of *Streptococcus agalactiae* in milk. **Journal of Dairy Science**, v. 85, p. 1717-1723, 2002.
- (17) RAMESH, A., PADMAPRIYA, B.P., CHANDRASHEKAR, A., VARADARAJ, M.C. Application of a convenient DNA extraction method and multiplex PCR for the direct detection of *Staphylococcus aureus* and *Yersinia enterocolitica* in milk samples. **Molecular and Cellular Probes**, v. 16. p. 307-314, 2002.
- (18) NAKAYAMA, A., OKAYAMA, A., HASHIDA, M., YAMAMOTO, Y., TAKEBE, H., OHNAKA, T., TANAKA, T., IMAI, S. Development of a routine laboratory direct detection system of staphylococcal enterotoxin genes. **Journal of Medical Microbiology**, v. 55, p. 273 – 277, 2006.
- (19) BONAÏTI, C., PARAYRE, S., IRLINGER, F. Novel extraction strategy of ribosomal RNA and genomic DNA from cheese for PCR-based investigations. **International Journal of Food Microbiology**, v. 107, p. 171– 179, 2006.

- (20) PARAYRE, S. FALENTIN, H., MADEC, M.N., SIVIERI, K., LE DIZES, A.S., SOHIER, D., LORTAL, S. Easy DNA extraction method and optimization of PCR-temporal temperature gel electrophoresis to identify the predominant high and low GC-content bacteria from dairy products. **Journal of Microbiological Methods**, v. 69, p. 431 – 441, 2007.
- (21) LETERTRE, C.; PERELLE, S.; DILASSER, F.; FACH, P. A strategy on 5' nuclease multiplex PCR to detect enterotoxin genes *sea* to *sej* of *Staphylococcus aureus*. **Molecular and Cellular Probes**, v. 17, p. 227-235, 2003.
- (22) OMOE, K.; HU, D.L.; OMOE, H. T.; NAKANE, A.; SHINAGAWA, K. Comprehensive analysis of classical and newly described staphylococcal superantigenic toxin genes in *Staphylococcus aureus* isolates. **FEMS Microbiology Letters**, v. 246, p. 191-198, 2005.
- (23) SHARMA, N.K.; REES, C.E.D.; DODD, C.E.R. Development of a single-reaction multiplex PCR toxin typing assay for *Staphylococcus aureus* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, p. 1347-1353, 2000.
- (24) NÁJERA-SANCHEZ, G.; MALDONADO-RODRÍGUEZ, R.; 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.
- (25) NAKANO, S.; KOBAYASHI, T.; FUNABIKI, K.; MATSUMURA, A.; NAGAO, Y.; YAMADA, T. PCR detection of *Bacillus* and *Staphylococcus* in Various foods. **Journal of Food Protection**, v. 67, p. 1271-1277, 2004.
- (26) 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.
- (27) JARRAUD, S.; PEYRAT, M. A.; LIM, A.; TRISTAN, A.; BÈS, M.; MOUGEL, C. ETIENNE, J.; VANDENESCH, F.; BONNEVILLE, M.; LINA, G. *egc*, highly prevalent operon of enterotoxin gene, forms a putative nursery of superantigens in *Staphylococcus aureus*. **The Journal of Immunology**, v.166, p.669-677, 2001. Nota de correção em: **The Journal of Immunology**, v.166:4260, 2001.

5 ARTIGO 2: PCR para Detecção de *Staphylococcus aureus* Enterotoxigênicos em Queijo Minas Frescal

PCR PARA DETECÇÃO DE *Staphylococcus aureus* ENTEROTOXIGÊNICOS EM QUEIJO MINAS FRESCAL

PCR para detecção de *S. aureus* em queijo

Fernando ZOCHE¹ e Wladimir Padilha da SILVA^{2,*}

RESUMO

Staphylococcus aureus é um microrganismo patogênico freqüentemente encontrado em leite e derivados lácteos. Sua identificação e a determinação de sua enterotoxigenicidade indicam o potencial para produção de enterotoxinas (EE), as quais, após pré-formadas e ingeridas com o alimento podem causar intoxicação alimentar. Entretanto, os métodos tradicionais de isolamento e identificação, além de demorados, apenas inferem sua toxigenicidade. O objetivo deste estudo foi padronizar PCR para amplificação de genes de EE utilizando DNA de *S. aureus* extraído diretamente de queijo Minas Frescal artificialmente contaminado para diagnóstico rápido, sensível e específico desse microrganismo. Reações específicas para os genes *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *sei*, *selj*, *selm* e *selo*, apresentaram sensibilidade $\geq 10^2$ UFC de *S. aureus* por grama de queijo. Obteve-se amplificação com DNA extraído diretamente do queijo, sem necessidade de enriquecimento prévio da amostra, diminuindo o tempo total de análise. Com a PCR proposta neste estudo é possível detectar *S. aureus* enterotoxigênico em queijo Minas Frescal quando esse microrganismo encontra-se em baixas concentrações celulares.

PALAVRAS-CHAVE: contaminação, alimento, enterotoxinas, bactéria patogênica.

¹ Médico Veterinário (MV), Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial, DCTA, FAEM, UFPel. Email: fernandozocche@hotmail.com.

² MV, Professor Dr. do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial, DCTA, FAEM, UFPel. Email: silvawp@ufpel.edu.br.
Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Campus Universitário, caixa postal 354, CEP 96010-900, Pelotas, RS.

* a quem a correspondência deve ser enviada

PCR FOR ENTEROTOXIGENIC *Staphylococcus aureus* DETECTION IN MINAS FRESCAL CHEESE

SUMMARY

Staphylococcus aureus is a pathogenic microorganism frequently found in milk and dairy products. Its identification and determination of their enterotoxigenicity indicate the potential for enterotoxins (EE) production, which, after preformed and ingested with the food can cause food poisoning. However, the traditional methods of isolation and identification besides to spend much time, it have just been infer their toxigenicity. The aim of this study was to standardize a PCR for amplification of EE genes using DNA of *S. aureus* extracted directly of artificially contaminated Minas Frescal Cheese for fast sensitive and specific diagnosis that microorganism. Reactions were specific for *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *sei*, *selj*, *selm* and *selo* genes, showing sensitivity $\geq 10^2$ UFC of *S. aureus* per gram of cheese. There was amplification with DNA extracted directly from the cheese, without the need for prior enrichment of the sample, reducing the total time of analysis. With the PCR protocol purposed we can suggest that is possible to detect toxigenic *S. aureus* in Minas Frescal Cheese when this microorganism reaches in low cell concentrations.

KEYWORDS: contamination, food, enterotoxins, pathogenic bacteria.

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Staphylococcus* é formado por 41 espécies e 24 subespécies (EUZÉBY, 2008). Entre as bactérias desse gênero, *Staphylococcus aureus* é a mais relacionada a casos e a surtos de intoxicação alimentar devido à capacidade de grande parte de suas cepas produzirem enterotoxinas (EE) (CHEN, CHIOU e TSEN, 2004; SILVA, CARMO e SILVA, 2005), as quais, após pré-formadas e ingeridas com o alimento, podem causar sintomas tais como náuseas, vômitos, dores abdominais e diarreia (MEHROTRA, WANG e JOHNSON, 2000; JORGENSEN et al., 2005).

Até o momento, já foram descritas e purificadas 22 EE, das quais, dez estão envolvidas com intoxicação alimentar (EEA, EEB, EEC₁, EEC₂, EEC₃, EED, EEE, EEG, EEH e EEI). Embora as EE clássicas (EEA à EEE) sejam responsáveis por 95% dos surtos (VERNOZY-

1 ROZAND et al., 2004), novas evidências sugerem que essa prevalência pode variar. Na Noruega,
2 por exemplo, um estudo conduzido por JORGENSEN et al. (2005) demonstrou um surto de
3 intoxicação alimentar estafilocócica por EEH.

4 A intoxicação alimentar estafilocócica causada pela ingestão de derivados lácteos é
5 comum, sendo freqüentemente reportada (EVENSON et al., 1988; CARMO et al., 2002). Um dos
6 fatores responsáveis é o fácil acesso de *S. aureus* ao leite, uma vez que esse microrganismo é o
7 agente mais comum de mastite bovina (CENCI-GOGA et al., 2003; ZSCHÖCK et al., 2005).
8 Embora os tratamentos térmicos comumente utilizados para sanitizar/conservar o leite, assegurem
9 a destruição das células vegetativas, não são suficientes para inativar as EE, as quais, portanto,
10 poderão causar intoxicação alimentar. Além disso, *S. aureus* pode ser veiculado ao leite
11 pasteurizado, ou ao queijo, através de contaminação por meio de práticas deficientes de higiene e
12 manipulação e, uma vez presente nesses alimentos, pode se multiplicar e produzir EE.

13 O queijo Minas Frescal é um alimento tradicional, muito apreciado e bastante consumido
14 no Brasil (PERRY, 2004). Por ser um queijo semi-gordo e de muito alta umidade (PERRY,
15 2004), suas características podem favorecer a multiplicação de *S. aureus*, com conseqüente
16 produção de EE. A pesquisa tradicional de estafilococos nesse alimento é usualmente realizada
17 através de métodos convencionais, baseados em semeadura em meios de cultura seletivo-
18 diferencial, seguida de testes adicionais, tais como coagulase, catalase e termonuclease
19 (LANCETTE e BENNETT, 2001). No entanto, a realização desses testes a partir das cepas
20 isoladas de alimentos, além de não diferenciar *S. aureus* de outras espécies de estafilococos
21 capazes de produzir EE e de não identificar cepas enterotoxigênicas, torna laboriosa a prática
22 laboratorial, estendendo o tempo necessário para o diagnóstico (SILVA e GANDRA, 2004).

23 Diversos trabalhos reportaram o uso da amplificação *in vitro* do DNA pela reação em
24 cadeia da polimerase (PCR), para detecção de patógenos diretamente em alimentos (BONAÏTI,
25 PARAYRE e IRLINGER, 2006; CREMONESI et al., 2006; GANDRA, 2006; PARAYRE et al.,
26 2007). Para *S. aureus*, a detecção e a genotipagem de genes de EE para serem utilizados como
27 marcadores genéticos, têm sido realizadas por uniplex-PCR, multiplex-PCR e, mais
28 recentemente, através de sistemas de PCR em tempo real (SHARMA, REES e DODD, 2000;
29 TAMARAPU, McKILLIP e DRAKE, 2001; NÁJERA-SANCHEZ et al., 2003; KWON et al.,
30 2004). Embora essas técnicas moleculares de diagnóstico permitam a obtenção de resultados
31 rápidos, específicos e sensíveis, quando comparadas àquelas tradicionalmente utilizadas para a

detecção de *S. aureus* e de EE, sua eficácia é dependente de um procedimento de extração que permita a recuperação de um DNA puro, o que nem sempre é possível, principalmente quando se avaliam alimentos ricos em gordura e proteína, como por exemplo, os queijos.

Considerando o potencial de diagnóstico rápido e específico da PCR, a importância da determinação de *S. aureus* enterotoxigênicos diretamente em alimentos como fator relevante na avaliação epidemiológica de casos e surtos de intoxicação alimentar estafilocócica, bem como a importância da detecção precoce dessas cepas em alimentos, objetivou-se extrair DNA de *S. aureus* diretamente de queijo Minas Frescal e desenvolver uma PCR para amplificação de fragmentos de genes de EE.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Cepas bacterianas

As cepas de referência utilizadas para a padronização das reações PCR estão listadas na Tabela 1.

TABELA 1: Cepas de referência utilizadas nas PCR, com os respectivos genes avaliados.

Cepas	Genes de enterotoxinas	Referência
<i>S. aureus</i> FRI*S6	<i>sea, seb</i>	LETERTRE et al., 2003
<i>S. aureus</i> FRI*361	<i>sec, sed, seg, sei, selj, selm, selo</i>	KWON et al., 2004; OMOE et al., 2005; HWANG et al., 2007
<i>S. aureus</i> FRI*326	<i>see</i>	NAKAYAMA et al., 2006

* FRI – Food Research Institute

As cepas foram inoculadas individualmente em caldo Infusão de Cérebro e Coração (BHI - Acumedia®) e incubadas à 37°C por 18-24 horas. A determinação da concentração celular presente em BHI foi realizada por semeadura *pour plate* em ágar Padrão para Contagem (PCA - Acumedia®). Após, 1mL de cada cultivo de *S. aureus* em BHI foi repassado para o mesmo tubo de ensaio, totalizando 3mL. A concentração celular foi ajustada com solução salina 0,85% realizando-se diluições decimais seriadas, até a obtenção de 10^7 à 10^2 UFC mL⁻¹.

2.2 Contaminação artificial do queijo Minas Frescal

A matriz alimentar utilizada neste estudo foi adquirida no comércio local de Pelotas, RS, e submetida à avaliação tradicional de *Staphylococcus aureus* (LANCETTE & BENNETT, 2001) para confirmar a ausência de células viáveis desse microrganismo. Após, alíquotas de queijo (10g) foram inoculadas com 10mL de solução salina 0,85% contendo um “mix” das cepas padrão de *S. aureus* (Tabela 1), em concentrações variando entre 10^7 e 10^2 UFC mL⁻¹, obtendo-se assim, um queijo contaminado com concentrações bacterianas variando entre 10^7 e 10^2 UFC g⁻¹.

2.3 Extração do DNA

Para a extração do DNA de *S. aureus* utilizou-se o método descrito por TAMARAPU, McKILLIP e DRAKE, (2001), com modificações, adicionando-se algumas etapas propostas por PARAYRE et al., (2007). Inicialmente, 10g do queijo artificialmente contaminado foram homogeneizadas com 45mL de uma solução de citrato de sódio 2%, de onde foram utilizados 10mL como unidade analítica. Após aquecimento a 50°C por 10 minutos, centrifugou-se a unidade analítica a 10.000 x *g* por 10 minutos em temperatura ambiente e, após a retirada do sobrenadante, suspendeu-se o *pellet* em 400μL de tampão de lise contendo Tris-HCl 50mM adicionado de EDTA 10mM e SDS 5%. A esse conteúdo adicionou-se 100μL de lisostafina (100μg mL⁻¹, Sigma®) e 20μL de proteinase K (20mg mL⁻¹) com posterior incubação em banho-maria a 37°C durante 1 hora. Posteriormente, adicionou-se igual volume de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) e homogeneizou-se suavemente por inversão do tubo. Após centrifugação a 16100 x *g* durante 13 minutos, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e o DNA foi precipitado com 800μL de etanol absoluto gelado, permanecendo à -20°C por, no mínimo, 2 horas. Decorrido esse período, centrifugou-se a mistura a 16100 x *g* durante 40 minutos a 4°C, descartou-se o sobrenadante, lavou-se o *pellet* com etanol 70% e, após centrifugação a 16100 x *g* por 3 minutos a 4°C, ressuspendeu-se o *pellet* de DNA em 30μL de água ultra pura estéril.

A integridade, qualidade e a quantidade de DNA extraído foram determinadas por eletroforese em gel de agarose, em comparação com o padrão de massa molecular DNAλ/*HindIII*.

2.4 Oligonucleotídeos iniciadores

A amplificação de fragmentos dos genes das enterotoxinas foi realizada com os oligonucleotídeos iniciadores descritos na Tabela 2.

TABELA 2: Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na amplificação de fragmentos dos genes de enterotoxinas estafilocócicas.

Descrição/gene alvo	Seqüência 5' → 3'	Posição no gene	Número de acesso ¹	Fragmentos estimados (pb)	Referência	
ESA1/ <i>sea</i>	ACGATCAATTTTACAGC	203 – 222	M18970	544	ROSEC e GIGAUD, 2002	
ESA2/ <i>sea</i>	TGCATGTTTTCAGAGTTAATC	726 – 746				
ESB1/ <i>seb</i>	GAATGATATTAATTCGCATC	621 – 640	M11118	416	ROSEC e GIGAUD, 2002	
ESB2/ <i>seb</i>	TCTTTGTCGTAAGATAAACTTC	1015 – 1036				
SEC1/ <i>sec</i>	GACATAAAAGCTAGGAATTT	676 – 695	X05815	257	NÁJERA-SANCHEZ et al., 2003	
SEC2/ <i>sec</i>	AAATCGGATTAACATTATCCA	912 – 932				
SED1/ <i>sed</i>	CAAATATATTGATATAATGA	4 – 23	M28521	330	Este estudo	
SED2/ <i>sed</i>	AGTAAAAAAGAGTAATGCAA	314 – 333				
Universal primer Forward for <i>see/see</i>	TGTATGTATGGAGGTGTAAC	388 – 407	M21319	213	SHARMA, REES e DODD, 2000	
Reverse primer for <i>see/see</i>	GCCAAACCTGTCTGAG	600 – 585				
Universal primer Forward for <i>selj/selj</i>	TGTATGTATGGAGGTGTAAC	1298 – 1317	AF053140	531	KWON et al., 2004	
Reverse primer for <i>selj/selj</i>	AGTTCACCTGACTTCAACG	1828 – 1809				
SEG1/ <i>seg</i>	TGCTATCGACACACTACAACC	*4758 – 4778	AF285760	704	McLAUHLIN et al., 2000	
SEG2/ <i>seg</i>	CCAGATTCAAATGCAGAACC	*5461 – 5442				
SEI1/ <i>sei</i>	GACAACAAAACCTGTCGAACTG	*2087 – 2108		630		
SEI2/ <i>sei</i>	CCATATTCTTTGCCTTTACCAG	*2716 – 2695				
SEIM1/ <i>selm</i>	CCAATTGAAGACCACCAAAG	*1544 – 1563		517		
SEIM2/ <i>selm</i>	CTTGTCTGTTCCAGTATCA	*2060 – 2042				
SEIO1/ <i>selo</i>	AGTCAAGTGTAGACCCTATT	*494 – 513		534	BLAIOTTA et al., 2004	
SEIO2/ <i>selo</i>	TATGCTCCGAATGAGAATGA	*1027 – 1008				

¹ número de acesso no *GenBank*, * posição no *enterotoxin gene cluster*.

2.5 Reação em cadeia da polimerase

Inicialmente, estabeleceram-se as melhores condições para as PCR, testando-se temperaturas de anelamento entre 44°C e 55°C para todos os oligonucleotídeos iniciadores e todas as concentrações de DNA obtidas.

1 Padronizou-se PCR uniplex para cada gene de EE e, para amplificação dos fragmentos
2 de *sea*, *seb*, *sec* e *sed*, cada reação consistiu de 10pmol de cada um dos oligonucleotídeos ESA1 e
3 2, ESB1 e 2, SEC1 e 2 e SED1 e 2, solução tampão para PCR contendo 1,25mM de KCl e
4 0,5mM de Tris-HCl (pH 8,4), 5mM de cloreto de magnésio, 218μM de dNTPs mix, 1,5U de *Taq*
5 DNA polimerase, 10 a 100ng de DNA e água ultra pura esterilizada totalizando 40μL de volume
6 final.

7 A amplificação de fragmentos dos genes *see* e *selj*, foi realizada em reações uniplex
8 contendo 20pmol dos oligonucleotídeos (10pmol do *Universal Forward Primer* e 10pmol do
9 *Reverse Primer for see* ou *Reverse Primer for selj*), solução tampão para PCR com 1,25mM de
10 KCl e 0,5mM de Tris-HCl (pH 8,4), 4mM de cloreto de magnésio, 100μM de dNTPs mix, 1,5U
11 de *Taq* DNA polimerase, e água ultra pura esterilizada, totalizando 25μL por tubo. Foram
12 utilizadas quantidades entre 10 e 100ng de DNA.

13 Os fragmentos dos genes *seg*, *sei*, *selm* e *selo*, foram amplificados em reações uniplex
14 consistindo de 10pmol de cada um dos oligonucleotídeos, solução tampão para PCR contendo
15 1,25mM de KCl e 0,5mM de Tris-HCl (pH 8,4), 2,5mM de cloreto de magnésio, 180μM de
16 dNTPs mix, 1U de *Taq* DNA polimerase, e água ultra pura esterilizada, totalizando 25μL por
17 tubo. Quantidades entre 10 e 100ng de DNA foram utilizadas como molde na PCR.

18 A amplificação dos fragmentos alvo foi realizada em termociclador (*MJ Research, PTC*
19 *– 100, Peltier Thermal Cycler*). No programa para *sea*, *seb*, *sec* e *sed*, utilizou-se desnaturação
20 inicial do DNA a 95°C por 5 min, seguida de 32 ciclos (95°C – 1 min, 44,5°C – 1 min e 72°C – 1
21 min), e de extensão final à 72°C por 10 min. Para *see* e *selj* utilizou-se desnaturação inicial do
22 DNA à 95°C por 5 min, seguida de 32 ciclos (95°C – 45 seg, 51°C – 45 seg e 72°C – 45 seg), e
23 de extensão final a 72°C por 10 min. Para *seg*, *sei*, *selm* e *selo* a desnaturação inicial do DNA foi
24 realizada à 95°C por 3 min, seguida de 30 ciclos (95°C – 10 seg e 55°C – 75 seg), e de extensão
25 final a 72°C por 7 min.

26 Os produtos de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1%, contendo
27 brometo de etídeo, e visualizados sob iluminação ultra-violeta. O marcador de massa molecular
28 utilizado foi o 100 pb DNA Ladder (BioLabs® e Invitrogen®).

29

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo objetivou-se desenvolver PCR para amplificação de fragmentos dos genes *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *sei*, *selj*, *selm* e *selo*, codificadores de enterotoxinas de *S. aureus*, a partir de DNA extraído diretamente de queijo Minas Frescal, que permitam detectar esse microrganismo de forma específica, sensível e rápida.

Para a calibração da PCR foi necessário testar diferentes temperaturas de anelamento, das quais, 44,5°C mostrou-se a mais adequada para amplificação de *sea*, *seb*, *sec* e *sed*, 51°C para *see* e *selj*, e 55°C para *seg*, *sei*, *selm* e *selo*. Salienta-se que, mesmo nas temperaturas ideais de anelamento, ocorreu amplificação de fragmentos inespecíficos, no entanto, sua presença não interferiu na visualização dos produtos de amplificação esperados, como pode ser visualizado na Figura 1. Alimentos frescos, tal como o queijo Minas Frescal, caracterizam-se por possuir elevada microbiota intrínseca, cujo DNA pode ter favorecido a amplificação de fragmentos inespecíficos. Além disso, há alta similaridade genética entre os genes das EE (JARRAUD et al., 2001), o que, segundo KWON et al. (2004), pode facilitar o anelamento inespecífico dos *primers Forward*.

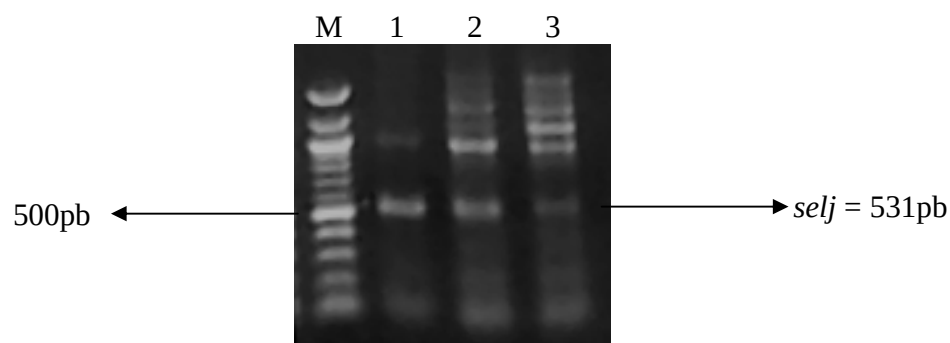


FIGURA 1: Eletroforese em gel de agarose 1% de produtos de PCR realizada com DNA de *S. aureus*. Coluna 1: fragmento de *selj* (531pb) obtido a partir de DNA de *S. aureus* em Queijo Minas Frescal inoculado com 10^4 UFC.g⁻¹. Coluna 2: fragmento de *selj* (531pb) obtido a partir de DNA de *S. aureus* em Queijo Minas Frescal inoculado com 10^3 UFC.g⁻¹. Coluna 3: fragmento de *selj* (531pb) obtido a partir de DNA de *S. aureus* em Queijo Minas Frescal inoculado com 10^2 UFC.g⁻¹. Coluna M – marcador de massa molecular *Ladder* 100pb (BIOLABS®).

Foi possível detectar, de forma específica, os genes *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *sei*, *selj*, *selm* e *selo* de *S. aureus* a partir do DNA extraído diretamente do queijo Minas Frescal, cujos produtos de amplificação podem ser visualizados na Figura 2.

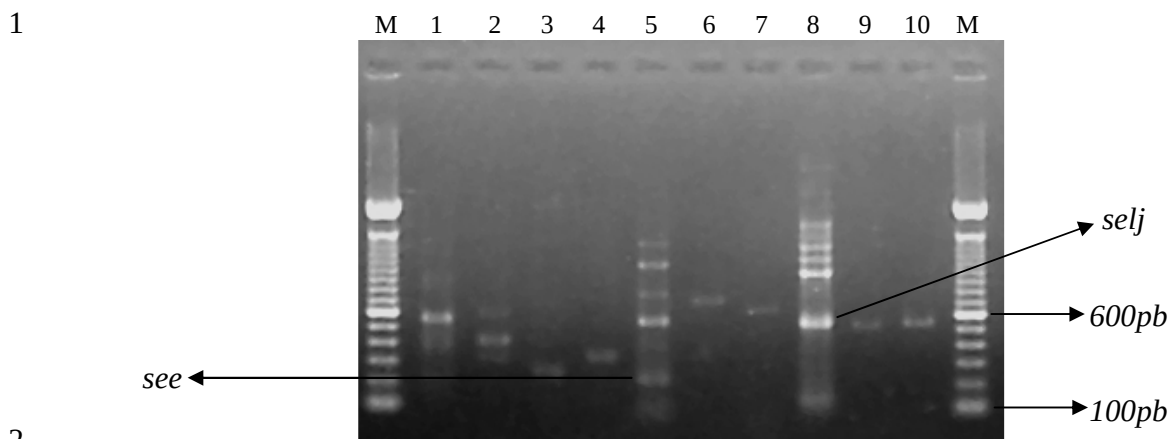


FIGURA 2: Eletroforese em gel de agarose 1%, de produtos de PCR realizada com DNA de *S. aureus* extraído diretamente de Queijo Minas Frescal inoculado com 10^2 UFCg⁻¹ – Coluna M: Marcador de massa molecular *Ladder* 100pb (Invitrogen®); Coluna 1: fragmento de *sea* (544pb); Coluna 2: fragmento de *seb* (416pb); Coluna 3: fragmento de *sec* (257pb); Coluna 4: fragmento de *sed* (330pb); Coluna 5: fragmento de *see* (213pb); Coluna 6: fragmento de *seg* (704pb); Coluna 7: fragmento de *sei* (630pb); Coluna 8: fragmento de *selj* (531pb); Coluna 9: fragmento de *selm* (517pb); Coluna 10: fragmento de *selo* (534b).

Poucos trabalhos descrevem técnicas moleculares para diagnóstico desse microrganismo diretamente em queijos, podendo-se citar, como exemplos, os realizados com queijo cheddar (TAMARAPU, McKILLIP e DRAKE, 2001), queijo Livarot (BONAÏTI, PARAYRE e IRLINGER, 2006) e queijo Emmental (PARAYRE et al., 2007). Com queijo Minas Frescal, um produto típico do Brasil, não há relato na literatura. Um dos principais motivos para o baixo número de trabalhos que obtém êxito no diagnóstico direto de patógenos bacterianos em queijos, é que esse alimento é rico em gorduras, proteínas e outros componentes que podem interferir na PCR. Nesse aspecto, TAMARAPU, McKILLIP e DRAKE (2001), relatam que, durante o processo de extração do DNA de *S. aureus* em queijo, é necessária a eliminação da maior quantidade possível de resíduos da matriz alimentar que possam interferir na PCR, e que utilizaram para esse fim, solventes orgânicos para eliminação da gordura do queijo, diferente deste estudo, onde a remoção do conteúdo lipídico foi obtida por centrifugação. NAKANO et al. (2004) e CREMONESI et al. (2006), também citam que íons Ca^{+2} , proteinases, gordura e proteínas do queijo podem reduzir consideravelmente a sensibilidade da reação por dificultar o acesso da DNA polimerase ao DNA alvo, o que não foi evidenciado neste estudo, uma vez que foi possível amplificar fragmentos de todos os genes de EE testados.

Um aspecto que deve ser ressaltado nos resultados obtidos no presente estudo é que não houve necessidade de enriquecimento prévio da amostra e/ou de purificação da unidade analítica, o que aumentaria significativamente o tempo para a conclusão da análise. Alguns autores

(TAMARAPU, McKILLIP e DRAKE, 2001; RAMESH et al., 2002; NAKANO et al., 2004; BONAĬTI, PARAYRE e IRLINGER, 2006; CREMONESI et al., 2006; GANDRA, 2006; HWANG et al., 2007) que utilizaram PCR para diagnóstico de *S. aureus* diretamente em leite e derivados lácteos demonstram a necessidade dessas etapas anteriormente a extração do DNA, enquanto outros (BONAĬTI, PARAYRE e IRLINGER, 2006) relatam que além do aumento do tempo necessário à conclusão da análise, houve decréscimo na quantidade de DNA recuperado e na sensibilidade da PCR.

A identificação de EE em alimentos é realizada, usualmente, por técnicas imunológicas (VERNOZY-ROZAND et al., 2004). Todos os kits baseados em reações imunoenzimáticas disponíveis no mercado para detecção de EE têm como alvo as enterotoxinas clássicas (EEA, EEB, EEC, EED e EEE) e, embora essas sejam as mais comumente envolvidas em casos e surtos de intoxicação alimentar estafilocócica, todas as EE apresentam propriedades farmacológicas semelhantes, ou seja, são capazes de causar a doença (BLAIOTTA et al., 2004; JARRAUD et al., 2001; JORGENSEN et al., 2005). Dessa forma, técnicas voltadas à detecção de outras enterotoxinas e de seus genes, como proposto neste estudo (genes das EELJ, EELM e EELIO), apresentam relevância, uma vez que podem ser utilizadas em investigações epidemiológicas, de forma a rastrear a verdadeira incidência de cada EE na doença, bem como servir de marcadores genético-moleculares para cepas enterotoxigênicas de *S. aureus* em alimentos.

Na rotina laboratorial, a detecção de cepas de *S. aureus* em queijo Minas Frescal, envolve isolamento em meios seletivo-diferenciais, seguido de testes bioquímicos (CARMO et al., 2002; CENCI-GOGA et al., 2003; NÁJERA-SANCHEZ et al., 2003), entretanto, apesar de apresentar especificidade e sensibilidade satisfatória, é demorada, de alto custo e necessita considerável mão de obra (SILVA e GANDRA, 2004). Dessa forma, há demanda pelo desenvolvimento de técnicas mais rápidas, específicas, porém, com sensibilidade suficiente para identificar se o produto apresenta-se em conformidade com a legislação. Neste estudo, a PCR proposta foi capaz de identificar amostras de queijo Minas Frescal artificialmente contaminadas nas quais *S. aureus* portadores dos genes *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *sei*, *selj*, *selm* e *selo* estavam presentes em concentrações $\geq 10^2$ unidades formadoras de colônias por grama de queijo (UFC g⁻¹), conforme pode ser visualizado na Figura 2.

O resultado obtido é importante, tendo em vista que o limite de detecção obtido atende ao parâmetro máximo estipulado pela legislação brasileira (BRASIL, 2001), que estabelece 5 x

10²UFC g⁻¹, para estafilococos coagulase positiva em queijo Minas Frescal. Além disso, outro aspecto que deve ser levado em consideração, é que para *S. aureus* provocar intoxicação alimentar há necessidade de uma concentração celular de, aproximadamente, 10⁵ UFC g/mL⁻¹ de alimento, portanto, pelo menos 3log superior ao limite de detecção obtido com a PCR proposta neste estudo.

4. CONCLUSÃO

Através da PCR desenvolvida foi possível amplificar os genes *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *sei*, *selj*, *selm* e *selo* quando *S. aureus* estava presente em concentrações ≥10²UFC g⁻¹ de queijo Minas Frescal.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BLAIOTTA, G.; ERCOLINI, D.; PENNACCHIA, C.; FUSCO, V.; CASABURI, A.;PEPE, O.; VILLANI, F. PCR detection of staphylococcal enterotoxin genes in *Staphylococcus* spp. strains isolated from meat and dairy products. Evidence for new variants of seG and seI in *S. aureus* AB-8802. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, p. 719-730, 2004.

BONAÏTI, C., PARAYRE, S., IRLINGER, F. Novel extraction strategy of ribosomal RNA and genomic DNA from cheese for PCR-based investigations. **International Journal of Food Microbiology**, v. 107, p. 171– 179, 2006.

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**, Brasília, DF, 10 jan. 2001, seção I, n. 7-E, p. 46-53.

CARMO, L. S.; DIAS, R. S.; LINARDI, R. V.; SENA, M. J.; SANTOS, D. A.; FARIA, M. E.; PENA, E. C.; JETT, M.; HENEINE, L.G. Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in Minas cheese and raw milk in Brazil. **Food Microbiology**, v. 19. p. 9-14, 2002.

CENCI-GOGA, B.T., KARAMA, M., ROSSITTO, P.V., MORGANTE, R.A., CULLOR, J.S. Enterotoxin production by *Staphylococcus aureus* isolated from mastitic cows. **Journal of Food Protection**, v. 66, p.1693-1696, 2003.

CHEN, T.R., CHIOU, C.S., TSEN, H.Y. Use of novel PCR primers specific to the genes of staphylococcal enterotoxin G, H, I for the survey of *Staphylococcus aureus* strains isolated from food-poisoning cases and food samples in Taiwan. **International Journal of Food Microbiology**, v. 92, p. 189– 197, 2004.

CREMONESI, P., CASTIGLIONI, B., MALFERRARI, G., BIUNNO, I., VIRMECATI, C., MORONI, P., MORANDI, S., LUZZANA, M. Technical note: Improved method for rapid DNA extraction of mastitis pathogens directly from milk. **Journal of Dairy Science**, v. 89, p. 163-169, 2006.

EUZÉBY, J. P. **List of Bacterial names with Standing in Nomenclature**. Disponível em: <<http://www.bacterio.cict.fr/s/staphylococcus.html>>. Acesso em: 04 abr. 2008.

EVENSON, M.L.; HINDS, M.W.; BERNSTEIN, R.S. BERGDOLL, M.S. Estimation of human dose of staphylococcal enterotoxin A from a large outbreaks of staphylococcal food poisoning involving chocolate milk. **International Journal of Food Microbiology**, v. 25, p. 311-316, 1988.

GANDRA, E. A. **Multiplex PCR para detecção de *S. aureus*, *S. intermedius* e *S. hyicus* em leite UHT artificialmente contaminado**. Pelotas, 2006. 69p. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade Federal de Pelotas.

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.

JARRAUD, S.; PEYRAT, M. A.; LIM, A.; TRISTAN, A.; BÈS, M.; MOUGEL, C. ETIENNE, J.; VANDENESCH, F.; BONNEVILLE, M.; LINA, G. *egc*, highly prevalent operon of enterotoxin gene, forms a putative nursery of superantigens in *Staphylococcus aureus*. **The Journal of Immunology**, v.166, p.669-677, 2001. Nota de correção em: **The Journal of Immunology**, v.166:4260, 2001.

JORGENSEN, H. J.; MATHISEN, T.; LOVSETH, 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**, v. 252, p. 267-272, 2005.

KWON, N.H.; KIM, S.H.; PARK, K.T.; BAE, W.K.; KIM, J.Y.; LIM, J.Y.; AHN, J.S.; LYOO, K.S.; KIM, J.M.; JUNG, W.K.; NOH, K.M.; BOHACH, G.A.; PARK, Y.H. Application of extended single-reaction multiplex polymerase chain reaction for toxin typing of *Staphylococcus aureus* isolates in South Korea. **International Journal of Food Microbiology**, v.97. p. 137-145, 2004.

LANCETTE, G.A.; BENNETT, R.W. *Staphylococcus aureus* and Staphylococcal Enterotoxins. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4.ed. American Public Health Association (APHA), p. 387-400, 2001.

LETERTRE, C.; PERELLE, S.; DILASSER, F.; FACH, P. A strategy on 5' nuclease multiplex PCR to detect enterotoxin genes *sea* to *sej* of *Staphylococcus aureus*. **Molecular and Cellular Probes**, v. 17, p. 227-235, 2003.

McLAUHLIN, J.; NARAYANAN, G.L.; MITHANI, V.; O'NEILL, G. The detection of enterotoxins and toxic shock syndrome toxin genes in *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction. **Journal of Food Protection**, v. 63, p. 479-488, 2000.

1 MEHROTRA, M.; WANG, G.; JOHNSON, W.M. Multiplex PCR for detection of genes for
2 *Staphylococcus aureus* Enterotoxins, Esfoliative toxins, Toxic shock syndrome Toxin 1, and
3 Methicillin resistance. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38. p. 1032-1035, 2000.

4
5 NÁJERA-SANCHEZ, G.; MALDONADO-RODRÍGUEZ, R.; OLVERA, P. R.; GARZA, L. M.
6 Development of two multiplex polymerase chain reactions for the detection of enterotoxigenic
7 strains of *Staphylococcus aureus* isolated from foods. **Journal of Food Protection**, v. 66, p.
8 1055-1062, 2003.

9
10 NAKANO, S.; KOBAYASHI, T.; FUNABIKI, K.; MATSUMURA, A.; NAGAO, Y.;
11 YAMADA, T. PCR Detection of *Bacillus* and *Staphylococcus* in various foods. **Journal of Food**
12 **Protection**, v. 67, p. 1271-1277, 2004.

13
14 NAKAYAMA, A., OKAYAMA, A., HASHIDA, M., YAMAMOTO, Y., TAKEBE, H.,
15 OHNAKA, T., TANAKA, T., IMAI, S. Development of a routine laboratory direct detection
16 system of staphylococcal enterotoxin genes. **Journal of Medical Microbiology**, v. 55, p. 273 –
17 277, 2006.

18
19 OMOE, K.; HU, D.L.; OMOE, H. T.; NAKANE, A.; SHINAGAWA, K. Comprehensive analysis
20 of classical and newly described staphylococcal superantigenic toxin genes in *Staphylococcus*
21 *aureus* isolates. **FEMS Microbiology Letters**, v. 246 p. 191-198, 2005.

22
23 PARAYRE, S. FALENTIN, H., MADEC, M.N., SIVIERI, K., LE DIZES, A.S., SOHIER, D.,
24 LORTAL, S. Easy DNA extraction method and optimization of PCR-temporal temperature gel
25 electrophoresis to identify the predominant high and low GC-content bacteria from dairy
26 products. **Journal of Microbiological Methods**, v. 69, p. 431 – 441, 2007.

27
28 PERRY, K.S.P. Queijos: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. **Química Nova**,
29 v.27. p.293-300, 2004.

30

1 RAMESH, A., PADMAPRIYA, B.P., CHANDRASHEKAR, A., VARADARAJ, M.C.
2 Application of a convenient DNA extraction method and multiplex PCR for the direct detection
3 of *Staphylococcus aureus* and *Yersinia enterocolitica* in milk samples. **Molecular and Cellular**
4 **Probes**, v. 16, p. 307-314, 2002.

6 ROSEC, J. P.; GIGAUD, O. Staphylococcal enterotoxin genes of classical and new types
7 detected by PCR in France. **International Journal of Food Microbiology**, v.77, p.61-70, 2002.

9 SHARMA, N.K.; REES, C.E.D.; DODD, C.E.R. Development of a single-reaction multiplex
10 PCR toxin typing assay for *Staphylococcus aureus* strains. **Applied and Environmental**
11 **Microbiology**, v.66. p. 1347-1353, 2000.

13 SILVA, E. R.; CARMO, L. S.; SILVA, N. Detection of the enterotoxins A, B and C genes in
14 *Staphylococcus aureus* from goat and bovine mastitis in Brazilian dairy herds. **Veterinary**
15 **Microbiology**, v. 106, p. 103-107, 2005.

17 SILVA, W.P.; GANDRA, E.A. Estafilococos coagulase positiva: patógenos de importância em
18 alimentos. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v.18, 2004.

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

24 VERNIZY-ROZAND, C.; MAZUY-CRUCHAUDET, C.; BABIA, C.; RICHARD, Y.
25 Comparison of three immunological methods for detecting staphylococcal enterotoxins from
26 food. **Letters in Applied Microbiology**, v.10, p. 1-5, 2004.

28 ZSCHÖCK, M.; BÄRBEL, K.; WOLTER, W.; HAMMAN, H. P.; LÄMMLER, C. Pattern of
29 enterotoxin genes *seg*, *seh*, *sei* and *sej* positive *Staphylococcus aureus* isolated from bovine
30 mastitis. **Veterinary Microbiology**, v. 108, p. 243-249, 2005.

1 6. AGRADECIMENTOS

2

3 Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, processo
4 478100/04-3, pelo suporte financeiro.

5

**6 ARTIGO 3: Detecção de Genes do Agrupamento *egc* em *Staphylococcus aureus*
Isolados de Alimentos de Origem Animal**

Agrupamento *eqc* em *S. aureus* isolados em alimentos

RESUMO

Palavras-chave: agrupamento de genes, enterotoxinas estafilocócicas, contaminação, produtos de origem animal, PCR.

³ Médico Veterinário, Professor do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas. silvawp@ufpel.edu.br

SUMMARY

The objective of this study was to detect, through PCR, staphylococcal enterotoxins genes belonging to egc cluster (*seg*, *sei*, *selm*, *seln* and *selo*) in *S. aureus* isolated from different foods of animal origin and relate their presence on the origin of the strains. Forty one *S. aureus* strains was obtained, 14 from chicken carcasses, 14 from raw milk, 8 from sausages and 5 of cheese. We made for PCR, amplification a fragment (3375pb) of the egc cluster, and fragments of genes belonging to the cluster was amplified individually. The enterotoxigenic profile of *S. aureus* strains varied according to their origin, and was high the prevalence of strains isolated from chickens carcasses that had all the genes in the cluster. The strains from the other food, the prevalence of cluster was reduced. There presence of genes in the egc cluster in *S. aureus* strains isolated from foods of animal origin, however, different genotypes were observed depending on the source of isolation. In strains isolated from chickens, the presence of the complete egc cluster is high.

Keywords: egc cluster, staphylococcal enterotoxins, contamination, foods of animal origin, PCR.

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Staphylococcus* é formado por 41 espécies e 24 subespécies (EUZÉBY, 2008). Entre as bactérias desse gênero, *Staphylococcus aureus* é a mais relacionada a casos e a surtos de intoxicação alimentar devido à sua capacidade de produzir enterotoxinas (EE) (CENCI-GOGA et al., 2003, JORGENSEN et al., 2005). Vinte e duas EE já foram descritas e dez foram envolvidas com intoxicação alimentar (EEA, EEB, EEC₁, EEC₂, EEC₃, EED, EEE, EEG, EEH e EEI) (FRANCO e LANDGRAF, 2002; JORGENSEN et al., 2005). Embora a maioria dos casos e surtos de intoxicação alimentar estafilocócica seja atribuída às EE clássicas (EEA à EEE) (LETERTRE et al., 2003a), o recente avanço dos métodos de diagnóstico permitiu a identificação de casos de intoxicação alimentar envolvendo EEG, EEH e EEI, indicando que a importância das “novas” EE pode estar sendo subestimada (MARTÍN et al., 2004; CHEN, CHIOU e TSEN, 2004; JORGENSEN et al., 2005; IKEDA et al., 2005).

Em *S. aureus*, diversos genes codificadores de fatores de virulência estão presentes em elementos genéticos móveis, tais como ilhas de patogenicidade (SaPI), profagos e plasmídeos (NOVICK, 2003). Dentre as 4 ilhas de patogenicidade descritas em *S. aureus*, SaPI3 merece destaque por reunir um agrupamento de genes de EE, denominado *enterotoxin gene cluster* ou *cluster egc*, o qual agrupa os genes codificadores de EEG (*seg*), EEI (*sei*), EELM (*selm*), EEIN (*seln*) e EELO (*selo*), além de dois pseudogenes (*øent1* e *øent2*) ainda sem função biológica determinada (JARRAUD et al., 2001; van BELKUM et al., 2006). Esse agrupamento é descrito por alguns autores (JARRAUD et al., 2001; THOMAS et al., 2006) como “berço” das EE, onde, a partir de eventos de recombinação genética, poderia ser formado um novo gene codificador de um superantígeno estafilocócico capaz de causar intoxicação alimentar. Além disso, a possibilidade de ocorrer transferência horizontal de genes de EE do agrupamento *egc* entre distintas cepas de *S. aureus* também pode favorecer a evolução da bactéria e determinar o sucesso desse patógeno.

Alimentos preparados com produtos de origem animal são os mais envolvidos em casos e/ou surtos de intoxicação alimentar estafilocócica (CENCI-GOGA et al., 2003; FUEYO, MENDOZA e MARTÍN, 2005, RŮŽIČKOVÁ et al., 2008), portanto, a pesquisa de *S. aureus* nesses alimentos e a avaliação de seu potencial em produzir enterotoxinas, são fatores extremamente importantes na investigação epidemiológica dessa doença (LANCETTE e BENNETT, 2001). Assim sendo, o objetivo deste estudo foi detectar, através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), genes pertencentes ao agrupamento *egc* em *S. aureus* isolados em diferentes alimentos de origem animal e relacionar sua presença com a origem das cepas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O isolamento e a identificação dos isolados de *S. aureus* nos alimentos (carcaças de frango, embutidos cárneos, leite cru, e queijos Colônia e Minas Frescal) foram realizados de acordo com LANCETTE e BENNETT (2001). Dos 41 isolados, 14 foram oriundos de carcaça de frango, 14 de leite cru, 8 de embutidos cárneos e 5 de queijo.

As cepas de referência utilizadas foram *S. aureus* FRI361 e *S. aureus* FRI472, as quais, de acordo com OMOE et al. (2005), são portadoras dos genes alvo deste estudo.

2.1. Extração de DNA

A extração de DNA genômico de *S. aureus* foi realizada de acordo com o protocolo descrito por MATTHEWS et al. (1997), com modificações. Inicialmente, transferiu-se uma alçada de uma cultura de *S. aureus* em ágar Triptona Soja (TSA - Acumedia®) incubada a 37°C por 24 horas para 100µL de tampão Tris-EDTA (10mM Tris base e 5mM EDTA, pH 7,8) de forma a obter a turbidez 1,0 da escala de MacFarland. A lise do peptidoglicano celular ocorreu pela adição de 100µL de lisostafina (100µg.mL⁻¹, Sigma®) e incubação a 37°C em banho-maria por 45 minutos. Para completar a lise celular, adicionou-se 20µL de tampão Tris-EDTA (50mM Tris base e 20mM de EDTA, pH 7,8) contendo 20% de dodecil sulfato de sódio (SDS) (Pharmacia®) e 3µL de proteinase K (20mg.mL⁻¹, Invitrogen®), e incubou-se em banho-maria a 37°C por 1 hora. A seguir, adicionou-se 200µL de solução NaCl 5M e agitou-se manualmente por 15 segundos. Separou-se o material intracelular através de centrifugação a 10.000 x *g* por 15 minutos a 4°C e transferiu-se o sobrenadante para um novo microtubo. Adicionou-se fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1) para a liberação e separação de proteínas e, após, centrifugou-se a 10.000 x *g* por 15 minutos, transferindo-se o sobrenadante para um novo microtubo. A precipitação do DNA foi realizada com 800µL de álcool etílico absoluto gelado, e manutenção em -20°C por, no mínimo, 2 horas. Após, foi realizada nova centrifugação a 10.000 x *g* por 15 minutos a 4°C, ressuspensando-se o *pellet* com 30µL de água ultrapura estéril. A qualidade e a quantidade de DNA extraído foram estimadas por eletroforese em gel de agarose 1%, comparando-se com o padrão de massa molecular DNAλ/*Hind*III (Invitrogen®).

2.2. Oligonucleotídeos iniciadores e condições de PCR

Os oligonucleotídeos utilizados para amplificação dos fragmentos dos genes *seg*, *sei*, *selm*, *seln* e *selo* e para amplificação parcial do agrupamento *egc* estão descritos na Tabela 1.

1 Tabela 1: Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na detecção de genes do agrupamento *egc* em
 2 *S. aureus* isolados de alimentos na cidade de Pelotas, RS.

Oligonucleotídeo / gene alvo	Seqüência 5'→3'	Posição no agrupamento *	Fragmentos estimados (pb)	Referência
seg 1/ <i>seg</i>	TGCTATCGACACACTACAACC	4758-4778	704	McLauchlin et al. (2000)
seg 2**/ <i>seg</i>	CCAGATTCAAATGCAGAACC	5461-5442		
sei 1**/ <i>sei</i>	GACAACAAAACGTGCGAAACTG	2087-2108	630	
sei 2/ <i>sei</i>	CCATATTCTTTGCCTTTACCAG	2716-2695		
selm 1/ <i>selm</i>	CCAATTGAAGACCACCAAAG	1544-1563	517	BLAIOTTA et al. (2004)
selm 2/ <i>selm</i>	CTTGTCCTGTTCCAGTATCA	2060-2042		
seln 1/ <i>seln</i>	ATTGTTCTACATAGCTGCAA	3818-3837	682	
seln 2/ <i>seln</i>	TTGAAAAAACTCTGCTCCCA	4499-4480		
selo 1/ <i>selo</i>	AGTCAAGTGTAGACCCTATT	494-513	534	
selo 2/ <i>selo</i>	TATGCTCCGAATGAGAATGA	1027-1008		

3 *original accession number – AF285760 (JARRAUD et al. 2001); **sei 1 e seg 2: oligonucleotídeos utilizados para
 4 amplificação parcial de *egc*, correspondente a 3375pb.
 5

6 2.3. Amplificação parcial do agrupamento *egc*

7
 8 Utilizou-se um conjunto de oligonucleotídeos (sei 1 e seg 2, Tabela 1) para amplificar
 9 um fragmento de 3375 pares de base (pb) o qual inclui as seqüências nucleotídicas completas dos
 10 genes *sei*, *pent1*, *pent2*, *sen*, 610 nucleotídeos de *seg*, e 47 nucleotídeos pertencentes ao gene
 11 *selm*, utilizando-se uma PCR proposta por BLAIOTTA et al. (2004), com adaptações. As
 12 condições de reação consistiram de 12pmol de cada um dos oligonucleotídeos, 0,18mM de dNTP
 13 mix, 0,125mM de cloreto de magnésio, solução tampão para PCR contendo 2,5mM de KCl e
 14 1,0mM de Tris-HCl (pH 8,4), 2,5U de *Taq* DNA polimerase, e água ultra pura esterilizada,
 15 totalizando 50µL por tubo. Quantidades entre 10 e 100ng de DNA foram utilizadas como molde
 16 para a PCR. A amplificação do fragmento alvo foi realizada em termociclador (*MJ Research*,
 17 *PTC – 100, Peltier Thermal Cycler*), pela desnaturação inicial do DNA à 95°C por 3 minutos,
 18 seguido de 30 ciclos (95°C – 10 segundos, 72°C – 3,5 minutos), e de extensão final à 72°C por 7
 19 minutos. Os produtos de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1% contendo
 20 brometo de etídeo, e visualizados sob iluminação ultra-violeta. O marcador de massa molecular
 21 utilizado foi o DNA λ /HindIII (Invitrogen®).
 22

2.4. Análise de restrição do agrupamento *egc* parcial (3375pb)

Os produtos de PCR obtidos com os oligonucleotídeos sei 1 e seg 2 a partir do DNA de *S. aureus* FRI361 e *S. aureus* FRI472 foram purificados por *GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (Amersham Biosciences) e digeridos com *EcoRI* e *HindIII*. Após a digestão, os fragmentos foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1 % e comparados com o marcador de massa molecular GeneRuler 1kb DNA Ladder plus (Fermentas®)

2.5 Amplificação dos genes *seg*, *sei*, *selm*, *seln* e *selo*

A amplificação de fragmentos dos genes *seg*, *sei*, *selm*, *seln* e *selo* foi realizada por PCR uniplex, adaptadas de BLAIOTTA et al. (2004), e compostas por 10pmol de cada um dos oligonucleotídeos descritos na Tabela 1, 0,025mM de dNTP mix, 0,0625mM de cloreto de magnésio, solução tampão para PCR contendo 1,25mM de KCl e 0,5mM de Tris-HCl (pH 8,4), 1U de *Taq* DNA polimerase, e água ultra pura esterilizada, totalizando 25µL por tubo. Quantidades entre 10 e 100ng de DNA foram utilizadas como molde para a PCR.

A amplificação dos fragmentos alvo foi realizada em termociclador (*MJ Research, PTC – 100, Peltier Thermal Cycler*), desnaturando-se o DNA à 95°C por 3 minutos, seguido de 30 ciclos (95°C – 10 segundos, 55°C – 75 segundos), e de extensão final à 72°C por 7 minutos. Os produtos de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1,2% contendo brometo de etídeo, e visualizados sob iluminação ultra-violeta. O marcador de massa molecular utilizado foi o 100pb DNA Ladder (Invitrogen®).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A presença do agrupamento *egc* e sua relação com a patogenicidade de *S. aureus* tem sido descrita em cepas isoladas de fontes clínicas (FERRY et al., 2005; BLAIOTTA et al., 2006; van BELKUM et al., 2006), entretanto, com cepas isoladas em alimentos, o número de trabalhos é bastante reduzido, portanto, objetivou-se avaliar a presença desse agrupamento em *S. aureus* isolados em alimentos de origem animal e verificar se há correlação com a fonte de isolamento.

Os oligonucleotídeos iniciadores sei 1 e seg 2 foram específicos para o fragmento de 3375 pb do agrupamento *egc*, o que pode ser comprovado através da digestão dos produtos de PCR com *EcoRI* e *HindIII*, obtendo-se fragmentos de 1654pb, 1085pb e 636pb, conforme descrito por JARRAUD et al. (2001) e BLAIOTTA et al. (2004). Os fragmentos gerados com a PCR e após a digestão podem ser observados na Figura 1.

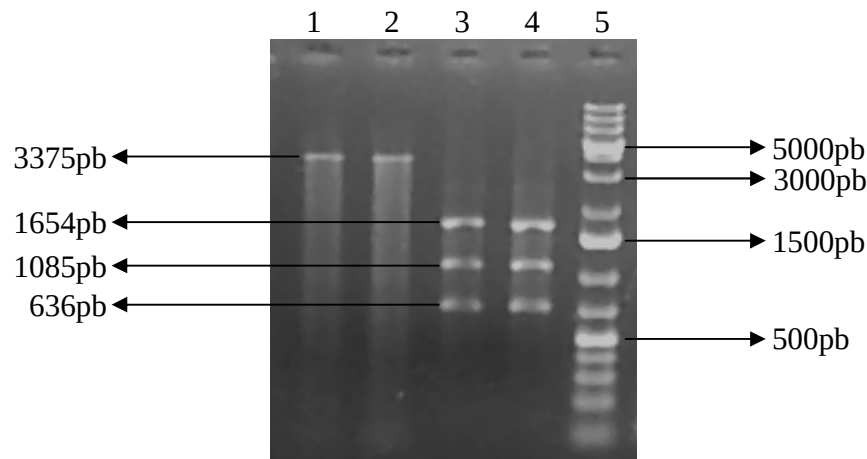


FIGURA 1: Eletroforese em gel de agarose 1%, de produtos de PCR realizada com DNA de *S. aureus* e oligonucleotídeos iniciadores sei 1 e seg 2. – Coluna 1: fragmento do agrupamento *egc* (3375pb) obtido a partir de DNA de *S. aureus* FRI361; Coluna 2: fragmento do agrupamento *egc* (3375pb) obtido a partir de DNA de *S. aureus* FRI472; Coluna 3: Fragmento do agrupamento *egc* obtido a partir de DNA de *S. aureus* FRI361, digerido com *EcoRI* e *HindIII*; Coluna 4: Fragmento do agrupamento *egc* obtido a partir de DNA de *S. aureus* FRI472, digerido com *EcoRI* e *HindIII*; Coluna 5: Marcador de massa molecular GeneRuler 1kb DNA Ladder plus (Fermentas®).

Da mesma forma, os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação de fragmentos dos genes *seg*, *sei*, *selm*, *seln* e *selo* foram específicos para os respectivos genes, conforme pode ser observado pelos produtos de PCR obtidos, mostrados na Figura 2.

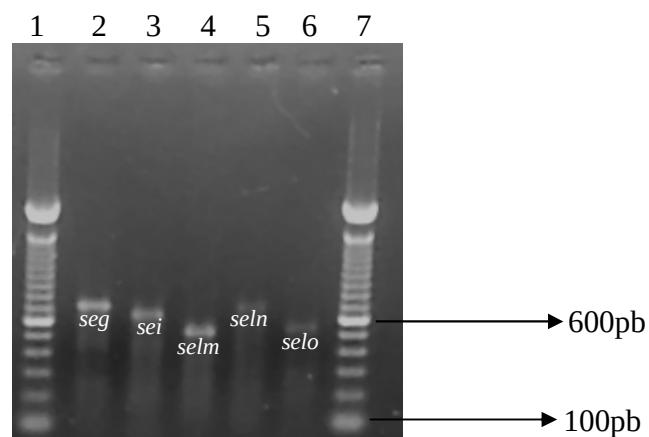


FIGURA 2: Eletroforese em gel de agarose 1% de produtos de PCR realizada com DNA de *S. aureus* FRI361 – Colunas 1 e 7: Marcador de massa molecular Ladder 100pb (Invitrogen®); Coluna 2: fragmento de *seg* (704pb); Coluna 3: fragmento de *sei* (630pb); Coluna 4: fragmento de *selm* (517pb); Coluna 5: fragmento de *seln* (682pb); Coluna 6: fragmento de *selo* (534pb).

Observou-se que o perfil enterotoxigênico das cepas de *S. aureus* variou de acordo com a sua origem, e houve relação entre a presença de determinados genes de EE e a fonte (alimento de origem animal) de onde a bactéria foi isolada. Os distintos genótipos encontrados nos diferentes alimentos podem ser visualizados na Tabela 2.

TABELA 2: Distribuição e porcentagem dos diferentes genótipos do agrupamento *egc* em *S. aureus* isolados em alimentos de origem animal.

Genótipos	Origem e número de cepas									
	carcaça de frango (n=14)		embutidos cárneos (n=8)		queijo tipo colônia e Minas Frescal (n=5)		leite cru (n=14)		Total (n=41)	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
<i>egc</i> ^{(-)*}	5	35,8	4	50	3	60	14	100	26	63,4
<i>egc</i> ^{(+)**}	9	64,2	1	12,5	-	-	-	-	10	24,4
<i>seg, selm, seln, selo</i>	-	-	1	12,5	2	40	-	-	3	7,3
<i>seln</i>	-	-	2	25	-	-	-	-	2	4,9

* não portadores de gene pertencente ao agrupamento *egc*;

** portadores de *seg, sei, selm, seln, selo*.

A heterogeneidade genética observada pode ser devida a necessidade da presença de determinados genes, os quais favoreceriam o estabelecimento do microrganismo em um hospedeiro e/ou alimento. Diversos trabalhos corroboram essa hipótese e descrevem um perfil toxigênico distinto e bastante amplo de *S. aureus* encontrado em alimentos de origem animal, como derivados lácteos (BLAIOTTA et al., 2004), embutidos cárneos (BANIA et al., 2006a) e derivados de pescado (SIMON e SANJEEV, 2007), e em diversos animais, como bovinos, caprinos, ovinos, aves, coelhos (SMYTH et al., 2005; VIMERCATI et al., 2006) e suínos (NITZSCHE, ZWEIFEL e STEPHAN, 2007; HWANG et al., 2007).

Observa-se que a presença do agrupamento *egc* completo (genes *seg, sei, selm, seln* e *selo*) foi elevada (64,2%) nas cepas oriundas de carcaça de frango. Essa porcentagem é inferior à relatada por SMYTH et al. (2005), que avaliaram 15 cepas de *S. aureus* oriundas de frango, e encontraram 86,7% das cepas carreando esses genes. Por outro lado, HWANG et al. (2007) caracterizaram molecularmente 87 cepas de *S. aureus* isoladas desse mesmo alimento, e observaram que 36,9% possuíam esse agrupamento completo. Embora haja diferença na porcentagem de presença do agrupamento, é interessante ressaltar que nos três estudos todas as cepas provenientes de frangos possuíam o agrupamento completo, não havendo variantes genéticas quanto a essa característica, o que pode denotar a necessidade da presença simultânea

1 dos cinco genes do agrupamento para um adequado estabelecimento de *S. aureus* naquele
2 hospedeiro e, conseqüentemente, para o desenvolvimento da patogenia.

3 Dez cepas portavam o agrupamento *egc* completo, entretanto, apenas uma (10%) foi
4 isolada em embutidos cárneos, índice semelhante ao relatado por BANIA et al. (2006a) que,
5 analisando 50 cepas de *S. aureus* isoladas desses alimentos, encontraram 6% com essa
6 característica. Em um isolado oriundo de embutidos não foi possível amplificar o fragmento do
7 gene *sei*. Esse resultado é interessante, uma vez que, embora o fragmento do gene *seg* tenha sido
8 detectado nessa cepa, há controvérsias na literatura em relação a coexistência dos genes *seg* e *sei*,
9 haja vista que CHEN, CHIOU e TSEN (2004) relataram que uma cepa de *S. aureus* pode carrear
10 o gene *seg* sem necessariamente possuir o gene *sei*, enquanto JARRAUD et al. (2001) e
11 NITZSCHE, ZWEIFEL e STEPHAN (2007) mostraram que os genes codificadores de EEG (*seg*)
12 e EEI (*sei*) sempre estão presentes numa mesma cepa.

13 Em trinta e uma cepas não houve amplificação do fragmento de 3375pb, utilizado nesse
14 estudo como marcador do agrupamento *egc* (*egc* parcial). É digno de nota que embora três dessas
15 cepas (1 proveniente de embutidos cárneos e 2 de queijos), carreassem os genes *seg*, *selm*, *seln* e
16 *selo*, e duas (isoladas em embutidos) possuíssem apenas o gene *seln*, nenhuma carregava o gene
17 *sei*, o que explica a ausência de amplificação do *egc* parcial.

18 Uma hipótese para a presença de cepas de *S. aureus* com agrupamento *egc* incompleto é
19 o alto nível de polimorfismo genético que esse agrupamento de genes pode apresentar
20 (LETERTRE et al., 2003b; BLAIOTTA et al., 2004; BLAIOTTA et al., 2006; THOMAS et al.,
21 2006). THOMAS et al. (2006), por exemplo, analisaram 666 cepas clínicas de *S. aureus* e
22 encontraram apenas uma que não apresentava o gene *sei*, na qual havia dois tipos de seqüência de
23 inserção posicionados na região cromossômica onde deveria estar localizado esse gene. Esses
24 autores sugerem que esse fenômeno ocorre quando parte do agrupamento *egc* é exportado ou
25 inserido no cromossomo de cepas intermediárias de *S. aureus*, e que, durante a transposição, pode
26 ter ocorrido a integração total ou parcial de um gene adjacente. Embora essa hipótese não tenha
27 sido testada neste estudo, há possibilidade das cepas que não possuíam o gene *sei*, ou que
28 carregavam apenas o gene *seln*, serem cepas intermediárias que participaram de eventos de
29 transposição de DNA.

30 É interessante frisar que nas cepas isoladas em leite cru não houve presença de genes do
31 agrupamento *egc*. Outro estudo (SANTANA et al., 2006) conduzido no Rio Grande do Sul já

1 havia demonstrado a baixa prevalência de *S. aureus* enterotoxigênicos nesse alimento, ao
2 contrário do evidenciado em outras regiões brasileiras, como por exemplo, em Pernambuco, onde
3 STAMFORD et al. (2006), encontraram 77% de *S. aureus* enterotoxigênicos em leite *in natura*.
4 Esses resultados vêm ao encontro de diversos estudos (CENCI-GOGA et al., 2003;
5 LONCAREVIC et al., 2005; NITZSCHE, ZWEIFEL e STEPHAN, 2007) que demonstraram alta
6 variabilidade genética entre cepas de *S. aureus* e que atribuem essa distinta enterotoxigenicidade
7 à uma necessidade de adaptação do microrganismo ao ambiente e/ou hospedeiro. Por outro lado,
8 duas cepas isoladas em queijo apresentaram agrupamento *egc* incompleto, o que faz supor que
9 essas cepas tenham tido outra origem que não o leite. Uma provável fonte de contaminação pode
10 ter sido os manipuladores de alimentos, uma vez que esses produtos sofrem alta manipulação
11 após a pasteurização do leite, hipótese que pode ser corroborada pelos estudos de BANIA et al.
12 (2006b) e LAWRYNOWICZ-PACIOREK et al. (2007), os quais encontraram o agrupamento *egc*
13 em *S. aureus* isolados de fossas nasais de manipuladores de alimentos.

14 15 4. CONCLUSÕES

16
17 Há presença de genes do agrupamento *egc* em *S. aureus* isolados em alimentos de
18 origem animal, entretanto, diferentes genótipos podem ser observados em função da fonte de
19 isolamento. Em *S. aureus* isolados de frangos a presença do agrupamento *egc* completo é
20 elevada.

21 22 5. REFERÊNCIAS

23
24 BANIA, J.; DABROWSKA, A.; BYSTRON, J.; KORZEKWA, K.; CHRZANOWSKA, J.;
25 MOLEND, J. Distribution of newly described enterotoxin-like genes in *Staphylococcus aureus*
26 from food. **International Journal of Food Microbiology**, v. 108, p. 36– 41, 2006a.

27
28 BANIA, J.; DABROWSKA, A.; KORZEKWA, K.; ZARCZYNSKA, A.; BYSTRON, J.;
29 CHRZANOWSKA, J. MOLEND, J. The profiles of enterotoxin genes in *Staphylococcus*
30 *aureus* from nasal carriers. **Letters in Applied Microbiology**, v. 42, p. 315-320, 2006b.

1 BLAIOTTA, G.; ERCOLINI, D.; PENNACCHIA, C.; FUSCO, V.; CASABURI, A.;PEPE, O.;
2 VILLANI, F. PCR detection of staphylococcal enterotoxin genes in *Staphylococcus* spp. strains
3 isolated from meat and dairy products. Evidence for new variants of seG and seI in *S. aureus* AB-
4 8802. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, p. 719-730, 2004.

6 BLAIOTTA, G.; FUSCO, V.; von EIFF, C.; VILLANI, F.; BECKER, K. Biotyping of
7 Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* by Enterotoxin Gene Cluster (*egc*) Polymorphism and
8 *spa* Typing Analyses. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, 6117-6123, 2006.

10 CENCI-GOGA, B. T., KARAMA, M., ROSSITTO, P. V., MORGANTE, R. A., CULLOR, J. S.
11 Enterotoxin production by *Staphylococcus aureus* isolated from mastitic cows. **Journal of Food**
12 **Protection**, v. 66, p.1693-1696, 2003.

14 CHEN, T. R., CHIOU, C. S., TSEN, H. Y. Use of novel PCR primers specific to the genes of
15 staphylococcal enterotoxin G, H, I for the survey of *Staphylococcus aureus* strains isolated from
16 food-poisoning cases and food samples in Taiwan. **International Journal of Food**
17 **Microbiology**, v. 92, p. 189– 197, 2004.

19 EUZÉBY, J. P. **List of Bacterial names with Standing in Nomenclature**. Disponível em:
20 <<http://www.bacterio.cict.fr/s/staphylococcus.html>>. Acesso em: 27 mar. 2008.

22 FERRY, T.; THOMAS, D.; GENESTIER, A.; BES, M.; LINA, G.; VANDENESCH, F.;
23 ETIENNE, J. Comparative Prevalence of Superantigen Genes in *Staphylococcus aureus* Isolates
24 Causing Sepsis With and Without Septic Shock. **Clinical Infectious Diseases**, v. 41, p. 771-777,
25 2005.

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

1 FUEYO, J. M.; MENDOZA, M. C.; MARTÍN, M. C. Enterotoxins and toxic shock syndrome
2 toxin in *Staphylococcus aureus* recovered from human nasal carriers and manually handled
3 foods: epidemiological and genetic findings. **Microbes and Infection**, v. 7, p. 187-194, 2005.

4
5 HWANG, S. Y.; KIM, S. H.; JANG, E. J.; KWON, N. H.; PARK, Y. K.; KOO, H. C.; JUNG, W.
6 K.; KIM, J. M.; PARK, Y. H. Novel multiplex PCR for the detection of the *Staphylococcus*
7 *aureus* superantigen and its application to raw meat isolates in Korea. **International Journal of**
8 **Food Microbiology**, v. 117, p. 99–105, 2007.

9
10 IKEDA, T.; TAMATE, N. YAMAGUCHI, K. MAKINO, S. Mass Outbreak of Food Poisoning
11 Disease Caused by Small Amounts of Staphylococcal Enterotoxins A and H. **Applied and**
12 **Environmental Microbiology**, v. 71, 2793-2795, 2005.

13
14 JARRAUD, S.; PEYRAT, M. A.; LIM, A.; TRISTAN, A.; BÈS, M.; MOUGEL, C. ETIENNE,
15 J.; VANDENESCH, F.; BONNEVILLE, M.; LINA, G. *egc*, highly prevalent operon of
16 enterotoxin gene, forms a putative nursery of superantigens in *Staphylococcus aureus*. **The**
17 **Journal of Immunology**, v.166, p.669-677, 2001.

18 Nota de correção em: **The Journal of Immunology**, v.166:4260, 2001.

19
20 JORGENSEN, H. J.; MATHISEN, T.; LOVSETH, A.; OMOE, K.; QVALE, K. S.;
21 LONCAREVIC, S.. An outbreak of staphylococcal food poisoning caused by enterotoxin H in
22 mashed potato made with raw milk. **FEMS Microbiology Letters**, v. 252, p. 267-272, 2005.

23
24 LANCETTE, G.A.; BENNETT, R.W. *Staphylococcus aureus* and Staphylococcal Enterotoxins.
25 **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4.ed. American
26 Public Health Association (APHA), p. 387-400, 2001.

27
28 LAWRYNOWICZ-PACIOREK, M.; KOCHMAN, M.; PIEKARSKA, K.; GROCHOWSKA, A.;
29 WINDYGA, B. The distribution of enterotoxin and enterotoxin-like genes in *Staphylococcus*
30 *aureus* strains isolated from nasal carriers and food samples. **International Journal of Food**
31 **Microbiology**, v. 117, p. 319–323, 2007.

1
2 LETERTRE, C.; PERELLE, S.; DILASSER, F.; FACH, P. Detection and genotyping by real-
3 time PCR of the staphylococcal enterotoxin genes *sea* to *sej*. **Molecular and Cellular Probes**, v.
4 17, p. 139-147, 2003a.

5
6 LETERTRE, C.; PERELLE, S.; DILASSER, F.; FACH, P. Identification of a new putative
7 enterotoxin SEU encoded by the *egc* cluster of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Applied**
8 **Microbiology**, v.95, p.38-43, 2003b.

9
10 LONCAREVIC, S.; JØRGENSEN, H. J.; LØVSETH, A.; MATHISEN, T.; RØRVIK, L. M.
11 Diversity of *Staphylococcus aureus* enterotoxin types within single samples of raw milk and raw
12 milk products. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, p. 344-350, 2005.

13
14 MATTHEWS, K. R.; ROBERSON, J.; GILLESPIE, B. E.; LUTHER, D. A.; OLIVER, S. P.
15 Identification and differentiation of coagulase-negative *Staphylococcus aureus* by polymerase
16 chain reaction. **Journal of Food Protection**, v.60, p.686-688, 1997.

17
18 MARTÍN, M. C.; FUEYO, J. M.; GONZALEZ-HEVIA, M. A.; MENDOZA, M.C. Genetic
19 procedures for identification of enterotoxigenic strains of *Staphylococcus aureus* from three food
20 poisoning outbreaks. **International Journal of Food Microbiology**, v.94, p.279-286, 2004.

21
22 McLAUHLIN, J.; NARAYANAN, G.L.; MITHANI, V.; O'NEILL, G. The detection of
23 enterotoxins and toxic shock syndrome toxin genes in *Staphylococcus aureus* by polymerase
24 chain reaction. **Journal of Food Protection**, v. 63, p.479-488, 2000.

25
26 NITZSCHE, S.; ZWEIFEL, C.; STEPHAN, R. Phenotypic and genotypic traits of
27 *Staphylococcus aureus* strains isolated from pig carcasses. **Veterinary Microbiology**, v. 120, p.
28 292-299, 2007.

29
30 NOVICK, R. P. Mobile genetic elements and bacterial toxinoses: the superantigen-encoding
31 pathogenicity islands of *Staphylococcus aureus*. **Plasmid**, v. 49, p.93-105, 2003.

OMOË, K.; HU, D. L.; OMOË, H. T.; NAKANE, A.; SHINAGAWA, K. Comprehensive analysis of classical and newly described staphylococcal superantigenic toxin genes in *Staphylococcus aureus* isolates. **FEMS Microbiology Letters**, v. 246, p. 191-198, 2005.

RŮŽIČKOVÁ, V.; KARPÍŠKOVÁ, R.; PANTŮČEK, R.; POSPÍŠILOVÁ, M.; ČERNÍKOVÁ, P.; DOŠKAŘ, J. Genotype analysis of enterotoxin H-positive *Staphylococcus aureus* strains isolated from food samples in the Czech Republic. **International Journal of Food Microbiology**, v.121, p.60-65, 2008.

SANTANA, E. H. W.; BELOTI, V.; OLIVEIRA, T. C. R. M.; MORAES, L. B.; TAMANINI, R.; SILVA, W. P. ESTAFILOCOCOS: MORFOLOGIA das colônias, produção de coagulase e enterotoxina a, em amostras isoladas de leite cru refrigerado. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 27, p. 639-646, 2006.

SILVA, E. R.; CARMO, L. S.; SILVA, N. Detection of the enterotoxins A, B and C genes in *Staphylococcus aureus* from goat and bovine mastitis in Brazilian dairy herds. **Veterinary Microbiology**, v. 106, p. 103-107, 2005.

SIMON, S. S.; SANJEEV, S. Prevalence of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in fishery products and fish processing factory workers. **Food Control**, v. 18, p. 1565-1568, 2007.

SMYTH, D. S.; HARTIGAN, P. J.; MEANEY, W. J.; FITZGERALD, J. R.; DEOBALD, C. F.; BOHACH, G. A.; SMYTH, C. J. Superantigen genes encoded by the *egc* cluster and SaPI_{bov} are predominant among *Staphylococcus aureus* isolated from cows, goats, sheep, rabbits and poultry. **Journal of Medical Microbiology**, v. 54, p. 401-411, 2005.

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.

1 THOMAS, D. Y.; JARRAUD, S.; LEMERCIER, B.; COZON, G.; ECHASSERIEAU, K.;
2 ETIENNE, J.; GOUGEON, M.; LINA, G.; VANDENESCH, F. Staphylococcal Enterotoxin-Like
3 Toxins U2 and V, Two New Staphylococcal Superantigens Arising from Recombination within
4 the Enterotoxin Gene Cluster. **Infection and Immunity**, v. 74, p. 4724-4734, 2006.

5
6 van BELKUM, A.; MELLES, D.C.; SNIJDERS, S.V.; LEEUWEN, W.B.; WERTHEIN, H.F.L.;
7 NOUWEN, J.L.; VERBRUGH, H.A.; ETIENNE, J. Clonal distribution and differential
8 occurrence of the enterotoxin gene cluster, *egc*, in carriage- versus bacteremia-associated isolates
9 of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, p. 1555-1557, 2006.

10
11 VIMERCATI, C.; CREMONESI, P.; CASTIGLIONI, B.; PISONI, G.; BOETTCHER, P. J.;
12 STELLA, A.; VICENZONI, G.; MORONI, P. Molecular Typing of *Staphylococcus aureus*
13 Isolated from Cows, Goats and Sheep with Intramammary Infections on the Basis of Gene
14 Polymorphisms and Toxins Genes. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 53, p. 423-428, 2006.

15
16 6. AGRADECIMENTOS

17
18 Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, processo
19 478100/04-3, pelo suporte financeiro.

7 Referências

AKKAYA, L.; SANCAK, Y. C. Growth abilities and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus* strains in herby cheese. **Bull Vet Inst Pulawy**, v. 51, p. 401-406, 2007.

ALMEIDA, A.D. et al. Pesquisa de *Staphylococcus* coagulase positivo em queijo minas frescal comercializado na cidade de Alfenas, MG. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.20, n. 147, p. 45-50, 2006.

AMSON, G. V.; HARACEMIV, S. M. C.; MASSON, M. L. Levantamento de dados epidemiológicos relativos à ocorrências/surtos de doenças transmitidas por alimentos (dtas) no Estado do Paraná – Brasil, no período de 1978 a 2000. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 30, n. 1139-1145, 2006.

ATANASSOVA, V.; MEINDL, A.; RING, C. Prevalence of *Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxins in raw pork and uncooked smoked ham – a comparison of classical culturing detection and RFLP-PCR. **International Journal of Food Microbiology**, v.68, p.105-113, 2001.

AVENA, R. M.; BERGDOLL, M. S. Purification and some physicochemical properties of enterotoxin C, *Staphylococcus aureus* strain 361. **Biochemistry**, v.6, p.1474-1480, 1967.

BACHERT, C.; GEVAERT, P.; VAN CAUWENBERGE, P. *Staphylococcus aureus* enterotoxins: a key in airway disease? **Allergy**, v. 57, p. 480-487, 2002.

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

- BANIA, J.; DABROWSKA, A.; BYSTRON, J.; KORZEKWA, K.; CHRZANOWSKA, J.; MOLEND, J. Distribution of newly described enterotoxin-like genes in *Staphylococcus aureus* from food. **International Journal of Food Microbiology**, v. 108, p.36-41, 2006.
- BARRETO, S. M.; COSTA, M. F. L. Investigação de um surto de intoxicação alimentar em Belo Horizonte, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, v. 14, p. 442-443, 1998.
- BECKER, K.; KELLER, B.; EIFF, C. V.; BRÜCK, M.; LUBRITZ, G.; ETIENNE, J.; PETERS, G. Enterotoxigenic potencial of *Staphylococcus intermedius*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, p.5551-5557, 2001.
- BECKER, K.; FRIEDRICH, A. W.; PETERS, G.; EIFF, C. von. Systematic survey on the prevalence of genes coding for staphylococcal enterotoxins SEIM, SEIO and SEIN. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 48, p. 488-495, 2004.
- BENNETT, R. W. Staphylococcal enterotoxin and its rapid identification in foods by enzyme-linked immunosorbent assay-based methodology. **Journal of Food Protection**, v. 68, p. 1264-1270, 2005.
- BERGDOLL, M. S.; BORJA, C. R.; AVENA, R. M. Identification of a new enterotoxin as enterotoxin C. **Journal of Bacteriology**, v.90, p.1481-1485, 1965.
- BERGDOLL, M. S.; BORJA, C. R.; ROBBINS, R. N.; WEISS, K. F. Identification of enterotoxin E. **Infection and Immunity**, v.4, p.593-595, 1971.
- BERGDOLL, M. S.; CRASS, B. A.; REISER, R.F.; ROBBINS, R. N.; DAVIS, J. P. A new Staphylococcal enterotoxin, enterotoxin F, associated with toxic-shock-syndrome *Staphylococcus aureus* isolates. **Lancet**, v. 2, p. 1017–1021, 1981.

BERGDOLL, M. S.; SURGALLA, M. J.; DACK, G. M. Staphylococcal enterotoxin: Identification of a specific precipitating antibody with enterotoxin neutralizing property. **Journal of Immunology**, v.83, p.334-338, 1959.

BETLEY, M. J.; HARRIS, T. O. Staphylococcal enterotoxins: characterization and relationship between structure and emetic activity. **Food Microbiology**, v. 11, p. 109-121, 1994.

BLAIOTTA, G.; ERCOLINI, D.; PENNACCHIA, C.; FUSCO, V.; CASABURI, A.;PEPE, O.; VILLANI, F. PCR detection of staphylococcal enterotoxin genes in *Staphylococcus* spp. strains isolated from meat and dairy products. Evidence for new variants of seG and sel in *S. aureus* AB-8802. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, p. 719-730, 2004.

BLAIOTTA, G.; FUSCO, V.; von EIFF, C.; VILLANI, F.; BECKER, K. Biotyping of Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* by Enterotoxin Gene Cluster (*egc*) Polymorphism and *spa* Typing Analyses. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, 6117-6123, 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamento Técnico para Fixação da Identidade e Qualidade do Queijo Minas Frescal. Portaria no. 352. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 08 de set. 1997, seção I, p. 13-68.

BRASIL. Resolução-RDC nº 12, de 02 de Janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasil, nº 7-E, p. 46-53, 10 Jan. 2001, seção I.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa no. 4 de 1 de março de 2004. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 05 de mar. 2004, seção I, p. 5.

CARMO, L. S.; DIAS, R. S.; LINARDI, R. V.; SENA, M. J.; SANTOS, D. A.; FARIA, M. E.; PENA, E. C.; JETT, M.; HENEINE, L.G. Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in Minas cheese and raw milk in Brazil. **Food Microbiology**, v. 19. p. 9-14, 2002.

CASMAN, E. P. Further serological studies of staphylococcal enterotoxin. **Journal of Bacteriology**, v.79, p.849-856, 1960.

CASMAN, E. P.; BENNETT, R. W.; DORSEY, A. E.; ISSA, J. A. Identification of a fourth staphylococcal enterotoxin, enterotoxin D. **Journal of Bacteriology**, v. 94, p.1875-1882, 1967.

CENCI-GOGA, B.T., KARAMA, M., ROSSITTO, P.V., MORGANTE, R.A., CULLOR, J.S. Enterotoxin production by *Staphylococcus aureus* isolated from mastitic cows. **Journal of Food Protection**, v. 66, p.1693-1696, 2003.

CHEN, T.R., CHIOU, C.S., TSEN, H.Y. Use of novel PCR primers specific to the genes of staphylococcal enterotoxin G, H, I for the survey of *Staphylococcus aureus* strains isolated from food-poisoning cases and food samples in Taiwan. **International Journal of Food Microbiology**, v. 92, p. 189– 197, 2004.

CHEN, T.R.; HSIAO, M.H.; CHIOU, C.S.; TSEN, H.Y. Development and use of PCR primers for the investigation of C1, C2 and C3 enterotoxin types of *Staphylococcus aureus* strains isolated from food-borne outbreaks. **International Journal of Food Microbiology**, v.71, p.63-70, 2001.

EUZÉBY, J. P. **List of Bacterial names with Standing in Nomenclature**. Disponível em: <<http://www.bacterio.cict.fr/s/staphylococcus.html>>. Acesso em: 27 mar. 2008.

EVENSON, M.L.; HINDS, M.W.; BERNSTEIN, R.S. BERGDOLL, M.S. Estimation of human dose of staphylococcal enterotoxin A from a large outbreaks of staphylococcal food poisoning involving chocolate milk. **International Journal of Food Microbiology**, v. 25, p. 311-316, 1988.

FERREIRA, H. B. Organização Gênica de Procariotos. In: ZAHA, Arnaldo. **Biologia Molecular Básica**. 3.ed. Porto Alegre: Mercado Aberto, 2001. p. 64-77.

FITZGERALD, J. R.; MONDAY, S. R.; FOSTER, T. J.; BOHACH, G. A.; HARTIGAN, P. J.; MEANEY, W. J.; SMITH, C. J. Characterization of a putative pathogenicity island from bovine *Staphylococcus aureus* encoding multiple superantigens. **Journal of Bacteriology**, v.183, p.63-70, 2001.

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

FREITAS, E. I. **Deteção de genes de enterotoxinas de *Staphylococcus* spp. isolados de queijo minas frescal**. 2005. 106p. Dissertação (Mestrado) - Instituto Nacional de Controle em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro.

FUEYO, J. M.; MENDOZA, M. C.; MARTÍN, M. C. Enterotoxins and toxic shock syndrome toxin in *Staphylococcus aureus* recovered from human nasal carriers and manually handled foods: epidemiological and genetic findings. **Microbes and Infection**, v. 7, p. 187-194, 2005.

HIROOKA, E. Y.; MULLER, E.; FREITAS, J. C. E.; VINCENTE, E.; YOSHIMOTO, Y., BERGDOLL, M.S. Enterotoxigenicity of *Staphylococcus intermedius* of canine origin. **International Journal of Food Microbiology**, v.7, p.185-191, 1988.

HOLLOWAY, M. Talking Bacteria. Microbes seem to talk, listen and collaborate with one another--fodder for the truly paranoid. Bonnie L. Bassler has been eavesdropping and

translating. Scientific America, February, 2004. Disponível em:

<http://www.sciam.com/article.cfm?ChanID=sa006&colID=30&articleID=0001F2DF-27D8-1FFB-A7D883414B7F0000>. Acesso em 10 de abr. de 2006.

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.

JAY, J. M. **Microbiologia moderna de los alimentos**. 4.ed. Zaragoza: Editorial Acribia S. A., 2002. 638 p.

JARRAUD, S.; PEYRAT, M. A.; LIM, A.; TRISTAN, A.; BÈS, M.; MOUGEL, C. ETIENNE, J.; VANDENESCH, F.; BONNEVILLE, M.; LINA, G. *egc*, highly prevalent operon of enterotoxin gene, forms a putative nursery of superantigens in *Staphylococcus aureus*. **The Journal of Immunology**, v.166, p.669-677, 2001.
Nota de correção em: **The Journal of Immunology**, v.166:4260, 2001.

JORGENSEN, H. J.; MATHISEN, T.; LOVSETH, 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**, v. 252, p. 267-272, 2005.

KARINO, E. H.; OKADA, C.; PAULA, C. H.; DOSSI, A.; MUTTA, T.; CASADO, N. Y. A.; MATOS, N. M. Relato de um surto de intoxicação alimentar por *Staphylococcus aureus*, em Paranavaí, PR. **Higiene Alimentar**, v. 4, p. 102-105, 1985.

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**. American Society for Microbiology. 7th. Edition. 1999. Cap.16, p.264-282.

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

KURODA, M.; OHTA, T.; UCHIYAMA, I.; BABA, T.; YUZAWA, H.; KOBAYASHI, I.; CUI, L.; OGUCHI, A.; AOKI, K.; NAGAI, Y.; LIAN, J.; ITO, T.; KANAMORI, M.; MATSUMARU, H.; MARUYAMA, A.; MURAKAMI, H.; HOSOYAMA, A.; MIZUTANI-UI, Y.; TAKAHASHI, N. K.; SAWANO, T.; INOUE, R.; KAITO, C.; SEKIMIZU, K.; HIRAKAWA, H.; KUHARA, S.; GOTO, S.; YABUZAKI, J.; KANEHISA, M.; YAMASHITA, A.; OSHIMA, K.; FURUYA, K.; YOSHINO, C.; SHIBA, T.; HATTORI, M.; OGASAWARA, N.; HAYASHI, H.; HIRAMATSU, K. Whole genome sequencing of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **The Lancette**, v. 357, p. 1225-1240, 2001.

KWON, N.H.; KIM, S.H.; PARK, K.T.; BAE, W.K.; KIM, J.Y.; LIM, J.Y.; AHN, J.S.; LYOO, K.S.; KIM, J.M.; JUNG, W.K.; NOH, K.M.; BOHACH, G.A.; PARK, Y.H. Application of extended single-reaction multiplex polymerase chain reaction for toxin typing of *Staphylococcus aureus* isolates in South Korea. **International Journal of Food Microbiology**, v.97. p. 137-145, 2004.

LAMPRELL, VILLARD, L.; CHAMBA, J. F.; BEUVIER, E.; BORGES, E.; MAURIN, F.; MAZEROLLES, G.; NOEL, Y.; KODJO, A. Identification and biotyping of coagulase positive staphylococci (CPS) in ripened French raw milk cheeses and their *in vitro* ability to produce enterotoxins. **Revue de Médecine Vétérinaire**, v. 155 p. 92-96, 2004.

LANCETTE, G.A.; BENNETT, R.W. *Staphylococcus aureus* and Staphylococcal Enterotoxins. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4.ed. American Public Health Association (APHA), p. 387-400, 2001.

LEBEAU, C.; VANDENESH, F.; GREENLAND, T.; NOVICK, R. P.; ETIENNE, J. Coagulase expression in *Staphylococcus aureus* is positively and negatively modulation by an agar-dependent mechanism. **Journal of Bacteriology**, v.176, p.5534-5536, 1994.

LETERTRE, C.; PERELLE, S.; DILASSER, F.; FACH, P. Detection and genotyping by real-time PCR of the staphylococcal enterotoxin genes *sea* to *sej*. **Molecular and Cellular Probes**, v. 17, p. 139-147, 2003a.

LETERTRE, C.; PERELLE, S.; DILASSER, F.; FACH, P. A strategy on 5' nuclease multiplex PCR to detect enterotoxin genes *sea* to *sej* of *Staphylococcus aureus*. **Molecular and Cellular Probes**, v. 17, p. 227-235, 2003b.

LETERTRE, C.; PERELLE, S.; DILASSER, F.; FACH, P. Identification of a new putative enterotoxin SEU encoded by the *egc* cluster of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Applied Microbiology**, v.95, p.38-43, 2003c.

LINA, G.; BOHACH, G. A.; NAIR, S. P.; HIRAMATSU, K.; MARCHE, E. J.; MARIUZZA, R. Standard nomenclature for the superantigens expressed by *Staphylococcus*. **The Journal of Infections Diseases**, v. 189, p. 2334-2336, 2004.

LISITA, M.O. **Evolução da população bacteriana na linha de produção do queijo minas frescal em uma indústria de laticínios**. 2005. 61f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Curso de Pós Graduação em Ciências, Escola de Agricultura Luiz de Queirós, Universidade de São Paulo.

LOIR, Y. L. ; BARON, F.; GAUTIER, M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. **Genetics and Molecular Research**, v.2, p.63-76, 2003.

MARTÍN, M. C.; FUEYO, J. M.; GONZALEZ-HEVIA, M. A.; MENDOZA, M.C. Genetic procedures for identification of enterotoxigenic strains of *Staphylococcus aureus* from

three food poisoning outbreaks. **International Journal of Food Microbiology**, v.94, p.279-286, 2004.

MEAD, P. S.; SLUTSKER, L.; DIETZ, V.; McCAIG, L. F.; BRESEE, J. S.; SHAPIRO, C.; GRIFFIN, P. M.; TAUXE, R. V. Food-related illness and death in United States. **Emerging Infections Diseases**, v.5, p. 607-625, 1999.

MOTTA, O. V., RIBEIRO, P. D., SILVA, W. D., ACOSTA, E. M. RNAIII inhibiting peptide (RIP) inhibits agr-regulated toxin production. **Peptides**, v.22, n.10, p.1621-1627, 2001.

MUNSON, S. H.; TREMAINE, M. T.; BETLEY, M. J.; WELCH, R. A. Identification and characterization of staphylococcal enterotoxin types G and I from *Staphylococcus aureus*. **Infection and Immunity**, v. 66, p.3337-3348, 1998.

NÁJERA-SANCHEZ, G.; MALDONADO-RODRÍGUEZ, R.; 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.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (NCBI). Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>>. Acesso em 12 mar. 2008.

NEWSOME, R. L.; STEWART, C. M. In: Bacteria Associated with Foodborne Diseases. Disponível em <<http://www.foodprocessing.com/whitepapers/2004/4.html>>. Acesso em 11 abr. 2006.

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.

NOVICK, R. P. Mobile genetic elements and bacterial toxinoses: the superantigen-encoding pathogenicity islands of *Staphylococcus aureus*. **Plasmid**, v. 49, p.93-105, 2003.

NOVICK, R. P.; SCHLIEVERT, P.; RUZIN, A. Pathogenicity and resistance islands of staphylococci. **Microbes and Infection**, v. 3, p. 585-594, 2001.

OMOE, K.; HU, D.L.; OMOE, H. T.; NAKANE, A.; SHINAGAWA, K. Comprehensive analysis of classical and newly described staphylococcal superantigenic toxin genes in *Staphylococcus aureus* isolates. **FEMS Microbiology Letters**, v. 246 p. 191-198, 2005.

OMOE, K.; HU, D.L.; OMOE, H. T.; NAKANE, A.; SHINAGAWA, K. Identification and characterization of a new staphylococcal enterotoxin-related putative toxin encoded by two kinds of plasmids. **Infection and Immunity**, v. 71 p. 6088-6094, 2003.

ORWIN, P. M.; LEUNG, D. Y.; DONAHUE, H. L.; NOVICK, R. P. SCHLIEVERT, P.M. Biochemical and biological properties of Staphylococcal enterotoxin K. **Infection and Immunity**, v. 69, p. 360-366, 2001.

ORWIN, P. M.; LEUNG, D. Y. M.; TRIPP, T. J.; BOHACH, G. A.; EARHART, C. A.; OHLENDORF, D. H.; SCHLIEVERT, P. M. Characterization of a novel staphylococcal enterotoxin-like superantigen, a member of the group V subfamily of pyrogenic toxins. **Biochemistry**, v. 41, p.14033-14040, 2002.

PEREIRA, M. L.; CARMO, L. S.; SANTOS, E. J.; BERGDOLL, M. S. Staphylococcal food poisoning from cream-filled cake in a metropolitan area of South-Eastern Brazil. **Revista de Saúde Pública**, v. 28, p. 406-409, 1994.

PINTO, B.; CHENOLL, E.; AZNAR, R. Identification and typing of food-borne *Staphylococcus aureus* by PCR-based techniques. **Systematic and applied microbiology**, V. 28, P. 340-352, 2005.

PROFT, T.; FRASER, J.D. Bacterial superantigens. **Clinical and Experimental Immunology**, v.133, p.299-306, 2003.

REISER, R.; ROBBINSON, R. N.; NOLETO, A. L. S.; KHOE, G. P.; BERGDOLL, M. S. Identification, purification and some physicochemical properties of staphylococcal enterotoxin C₃. **Infection and Immunity**, v.45, p.625-630, 1984.

RODRIGUES, K. L.; MOREIRA, A. N.; ALMEIDA, A. T. S.; CHIOCHETTA, D.; RODRIGUES, M. J.; BROD, C. S.; CARVALHAL, J. B.; ALEIXO, J. A. G. Intoxicação estafilocócica em restaurante institucional. **Ciência Rural**, v. 34, p. 297-299, 2004.

ROSEC, J.P.; GUIRAUD, J.P.; DALET, C.; RICHARD, N. Enterotoxin production by staphylococci isolated from foods in France. **International Journal of Food Microbiology**, v.35, p.213-221, 1997.

RUZIN, A.; LINDSAY, J.; NOVICK, R. P. Molecular genetics of SaPI1 – a mobile pathogenicity island in *Staphylococcus aureus*. **Molecular Microbiology**, v. 41, p. 365-377, 2001.

SABIONI, J. G., HIROOKA, E. Y.; SOUZA, M. L. R. Intoxicação alimentar por queijo minas contaminado com *Staphylococcus aureus*. **Revista de Saúde Pública**, v. 22, p. 458-461, 1988.

SILVA, E. R.; CARMO, L. S.; SILVA, N. Detection of the enterotoxins A, B and C genes in *Staphylococcus aureus* from goat and bovine mastitis in Brazilian dairy herds. **Veterinary Microbiology**, v. 106, p. 103-107, 2005.

SMYTH, D. S.; HARTIGAN, P. J.; MEANEY, W. J.; FITZGERALD, J. R.; DEOBALD, C. F.; BOHACH, G. A.; SMYTH, C. J. Superantigen genes encoded by the *egc* cluster and

SaPIbov are predominant among *Staphylococcus aureus* isolated from cows, goats, sheep, rabbits and poultry. **Journal of Medical Microbiology**, v. 54, p. 401-411, 2005.

SMYTH, D.S.; KENNEDY, J.; TWOHIG, J.; MIAJLOVIC, H.; BOLTON, D.; SMYTH, C. J. *Staphylococcus aureus* isolates from Irish domestic refrigerators possess novel enterotoxin and enterotoxin-like genes and are clonal in nature. **Journal of Food Protection**, v. 69, p. 508-515, 2006.

SORIANO, J. M.; FONT, G.; MOLTÓ, C.; MAÑES, J. Enterotoxigenic staphylococci and their toxins in restaurant foods. **Trends in Food Science & Technology**, v. 13, p.60-67, 2002.

SU, Y. C.; WONG, A. C. L. Current perspectives on detection of Staphylococcal enterotoxins. **Journal of Food Protection**, v.60, n.2, p.195-202, 1997.

SU, Y. C.; WONG, A. C. L. Identification and purification of a new staphylococcal enterotoxin H. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, p.1438-1443, 1995.

SU, Y. C.; WONG, A. C. L. Production of staphylococcal enterotoxin H under controlled pH and aeration. **International Journal of Food Microbiology**, v.39, p.87-91, 1998.

THOMAS, D. Y.; JARRAUD, S.; LEMERCIER, B.; COZON, G.; ECHASSERIEAU, K.; ETIENNE, J.; GOUGEON, M.; LINA, G.; VANDENESCH, F. Staphylococcal Enterotoxin-Like Toxins U2 and V, Two New Staphylococcal Superantigens Arising from Recombination within the Enterotoxin Gene Cluster. **Infection and Immunity**, v. 74, p. 4724-4734, 2006.

TRABULSI, L. R.; TEIXEIRA, L. M.; BUERIS, V. *Staphylococcus aureus*. In: TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 4.ed. São Paulo: Atheneu, 2004. p. 175-182.

ULRICH, R. G.; SIDELL, S.; TAYLOR, T. J.; WILHELMSSEN, C. L.; FRANZ, D. R. Staphylococcal enterotoxin B and related pyrogenic toxins. In: **Medical Aspects of Chemical and Biological Warfare** (Sidell FR, Takafugi ET, Franz DR, eds). Washington, DC: TMM Publications, p. 621-630, 1997.

VARNAN, A.H.; EVANS, M.G. **Foodborne pathogens**: an illustrated text. London, Mosby Year Book, p. 235-265, 1991.

VERAS, J. F.; SANTOS, D.A.; CARMO, L. S.; FERNANDES, T. M. G.; AZALIM, C. C.; SILVA, M. C. C.; MARTINS, R. T.; CERQUEIRA, M. M. O. P. Levantamento de surtos de toxinfecção alimentar envolvendo leite e produtos derivados no Estado de Minas Gerais, Brasil. In: VII Congresso Brasileiro de Higienistas de alimentos e I Congresso Latino-Americano de Higienistas de Alimentos, Belo Horizonte. **Anais do...**, 2003.

VERNOZY-ROZAND, C.; MAZUY-CRUCHAUDET, C.; BABIA, C.; RICHARD, Y. Comparison of three immunological methods for detecting staphylococcal enterotoxins from food. **Letters in Applied Microbiology**, v.10, p. 1-5, 2004.

VILLARD, L.; LAMPRELL, H.; BORGES, E.; MAURIN, F.; NOEL, Y.; BEUVIER, E.; CHAMBA, J. F.; KODJO, A. Enterotoxin D producing strains of *Staphylococcus aureus* are typeable by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). **Food Microbiology**, v. 22, p. 261-265, 2005.

WESELL, K. T. **Regulation of virulence gene expression in *Staphylococcus aureus***. 2000. 66f. Tese (Doutorado em Microbiologia). Mikrobiologiskt och Tumörbiologiskt Centrum (MTC), Karolinska Institutet, Estocolmo, Suécia.

WINZER, K.; WILLIAMS, P. Quorum sensing and the regulation of virulence gene expression in pathogenic bacteria. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 291, p. 131-143, 2001.

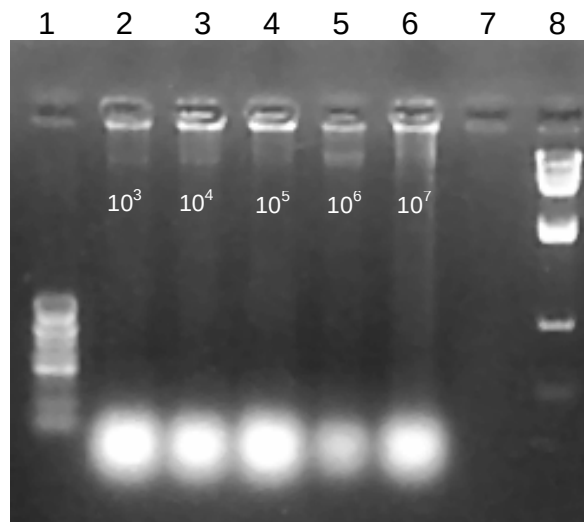
WORLD HEALTH ORGANIZATION. Foodborne intoxication due to *Staphylococcus aureus* in Japan. Disponível em <<http://www.who.int/disease-outbreak-news/n2000/july/10july2000.html>>. Acesso em 03 dez. 2004.

YARWOOD, J. M.; McCORNICK, J. K.; PAUSTIAN, M. L.; ORWIN, P. M.; KAPUR, V.; SCHLIEVERT, P. M. Characterization and expression analysis of *Staphylococcus aureus* pathogenicity island 3 – Implications for the evolution of staphylococcal pathogenicity islands. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 13138-13147, 2002.

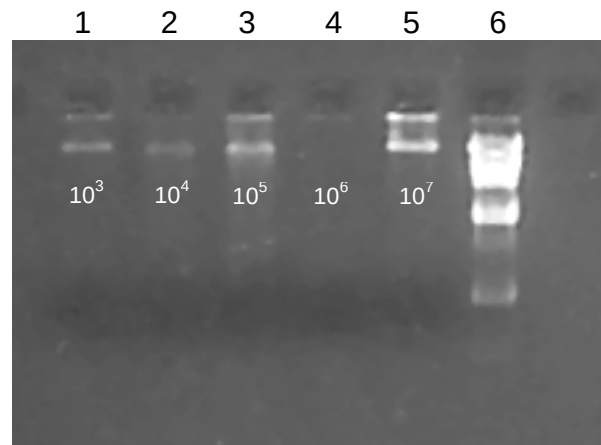
ZHANG, S.; IANDOLO, J. J.; STEWART, G. C. The enterotoxin D plasmid of *Staphylococcus aureus* encodes a second enterotoxin determinant (sej). **FEMS Microbiology Letters**, v. 168, p. 227-233, 1998.

ZSCHÖCK, M.; BÄRBEL, K.; WOLTER, W.; HAMMAN, H. P.; LÄMMLER, C. Pattern of enterotoxin genes *seg*, *seh*, *sei* and *sej* positive *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. **Veterinary Microbiology**, v. 108, p. 243-249, 2005.

APÊNDICE 1: Fotos mostrando o DNA extraído com o método A, durante a padronização do protocolo descrito no artigo 1, pág.39.

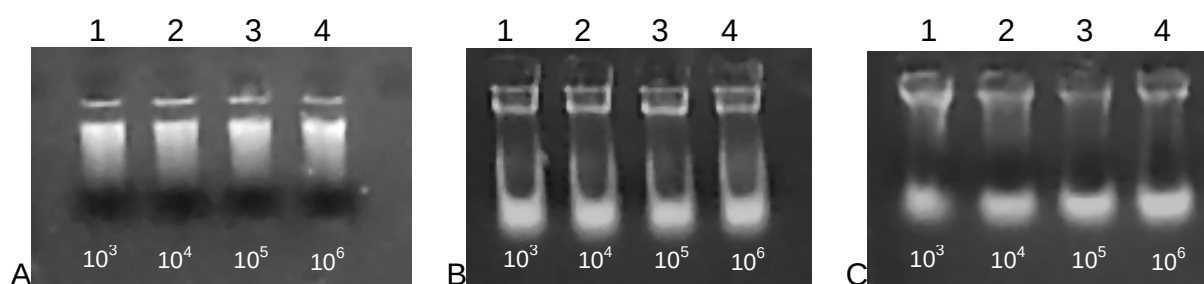


Eletoforese em gel de agarose 1%, de DNA extraído de *S. aureus* artificialmente inoculado em queijo Minas Frescal. Coluna 1: Marcador de massa molecular Ladder 100pb (Biolabs®); Colunas 2 à 6: DNA extraído utilizando-se o método A e com concentrações de *S. aureus* variando de 10^3 UFC.g⁻¹ a 10^7 UFC.g⁻¹ de queijo. Coluna 8 – Marcador de massa molecular DNA λ /HindIII (Invitrogen®).



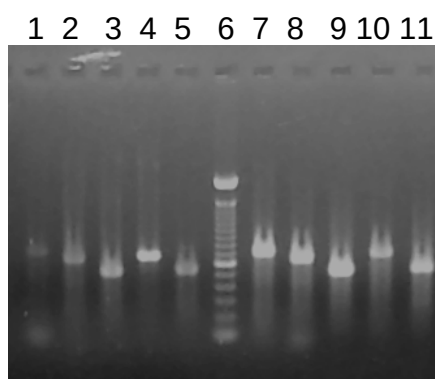
Eletoforese em gel de agarose 1%, de DNA extraído de *S. aureus* artificialmente inoculado em queijo Minas Frescal. Coluna 1 à 5: DNA extraído utilizando-se o método A e com concentrações de *S. aureus* variando de 10^3 UFC.g⁻¹ a 10^7 UFC.g⁻¹ de queijo. Coluna 6 – Marcador de massa molecular DNA λ /HindIII (Invitrogen®).

APÊNDICE 2: Fotos mostrando o DNA extraído com o método B, durante a padronização do protocolo descrito no artigo 1, pág. 40.

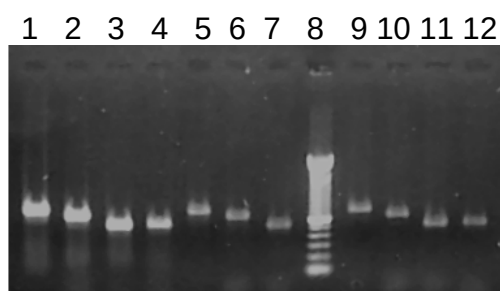


A, B e C: Eletroforese em gel de agarose 1%, de DNA extraído de *S. aureus* artificialmente inoculado em queijo Minas Frescal. Coluna 1 à 4: DNA extraído utilizando-se o método B e com concentrações de *S. aureus* variando de 10^3 UFC.g⁻¹ a 10^6 UFC.g⁻¹ de queijo.

APÊNDICE 3: Fotos mostrando ampliações de fragmentos dos genes do agrupamento *egc* em *S. aureus* isolados em alimentos de origem animal



Eletroforese em gel de agarose 1%, mostrando ampliações de fragmentos do agrupamento *egc* a partir de DNA de *S. aureus* isolados em carcaça de frango: coluna 1: fragmento do gene *seg* (704pb); coluna 2: fragmento do gene *sei* (630pb); coluna 3: fragmento do gene *selm* (517pb); coluna 4: fragmento do gene *seln* (682pb); coluna 5: fragmento do gene *selo* (534pb); coluna 6: marcador de massa molecular *Ladder* 100pb (Invitrogen®).



Eletroforese em gel de agarose 1%, mostrando ampliações de fragmentos de genes do agrupamento *egc* a partir de DNA de *S. aureus* isolados em queijo Minas Frescal (1 à 7) e embutido cárneo (9 à 12): coluna 1: fragmento do gene *seg* (704pb); coluna 2: fragmento do gene *selm* (517pb); coluna 3: fragmento do gene *seln* (682pb); coluna 5: fragmento do gene *selo* (534pb); coluna 5: fragmento do gene *selg* (704pb); coluna 6: fragmento do gene *selm* (517pb); coluna 7: fragmento do gene *seln* (682pb); coluna 9: fragmento do gene *selg* (704pb); coluna 10: fragmento do gene *selm* (517pb); coluna 11: fragmento do gene *seln* (682pb); coluna 12: fragmento do gene *selo* (534pb); coluna 8: marcador de massa molecular *Ladder* 100pb (Invitrogen®).