



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
FACULDADE DE AGRONOMIA ELISEU MACIEL

**MULTIPLEX PCR PARA DETECÇÃO DE *S. aureus*,
S. intermedius e *S. hyicus* EM LEITE UHT
ARTIFICIALMENTE CONTAMINADO.**

ELIEZER AVILA GANDRA

Tese apresentada à Universidade Federal de Pelotas, sob a orientação do Prof. Dr. Wladimir Padilha da Silva, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial, para a obtenção do título de Doutor em Ciências (D.S.).

PELOTAS
Rio Grande do Sul – Brasil
Março de 2006



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
FACULDADE DE AGRONOMIA ELISEU MACIEL

**MULTIPLEX PCR PARA DETECÇÃO DE *S. aureus*,
S. intermedius e *S. hyicus* EM LEITE UHT
ARTIFICIALMENTE CONTAMINADO.**

ELIEZER AVILA GANDRA

Tese apresentada à Universidade Federal de Pelotas, sob a orientação do Prof. Dr. Wladimir Padilha da Silva, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial, para a obtenção do título de Doutor em Ciências (D.S.).

PELOTAS
Rio Grande do Sul – Brasil
Março de 2006

ELIEZER AVILA GANDRA

MULTIPLEX PCR PARA DETECÇÃO DE *S. aureus*,
S. intermedius e *S. hyicus* EM LEITE UHT
ARTIFICIALMENTE CONTAMINADO.

Tese apresentada à Universidade Federal de Pelotas, sob a orientação do Prof. Dr. Wladimir Padilha da Silva, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial, para a obtenção do título de Doutor em Ciências (D.S.).

APROVADA: 14 de Março de 2006

Prof. Dr. Celso Medina Fagundes

Prof. Dr. Cesar Valmor Rombaldi

Prof^a. Dra. Gladis Aver Ribeiro

Prof. Dr. Wladimir Padilha da Silva
(Orientador)

Exalta os caminhos que teus pés trilharam, e
glorifica o que teus olhos alcançaram! Mas
tua obra só será seara redentora, se à
vivência juntares a ação criadora.

GOETHE

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Wladimir Padilha da Silva, meu orientador e amigo, pela confiança, ensinamentos, apoio e incentivo, presentes em todos os momentos, fundamentais para minha formação profissional.

A Profa. Dra. Maria Aparecida Fernandez, por me receber em seu laboratório, sempre com atenção, cortesia e dedicação, permitindo a viabilização e conclusão deste estudo.

Aos amigos Ms. Fernando Zocche e Dra. Silvana Carro por não medirem esforços para ajudar sempre que solicitados.

Às acadêmicas de Tecnologia em Alimentos da UEM Viviane Mayumi Resende e Crisley Padilha Corrêa pelo apoio e empenho na efetivação deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Jorge Adolfo Silva, pela ajuda constante.

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

À Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos no primeiro ano do Doutorado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro ao projeto de pesquisa que resultou nessa Tese.

Aos Profs. Dr. Fábio Leivas Leite e Dr. Paulo Dejalma Zimmer pela valiosa contribuição para melhoria deste trabalho.

Aos Profs. Dr. Celso Medina Fagundes (UFPe), Ms. Fábio Nascimento Fogaça (UEM), Dr. José Eduardo Olivo (UEM) e Ms. Cláudio Rafael Kuhn (UFPe) pela amizade, companheirismo e pronto auxílio.

A todos os amigos da UFPe, Márcia Araújo, Andréia, Elen, Márcia Raquel, Márcia Mata, Márcia Jantzen, Eduarda, Ana, Márcio Zanuzo, Luciano Luccheta, Cristina, Charli, Ana Clara e Fábio Padilha da Silva, pelas

inúmeras demonstrações de amizade, apoio e companheirismo, no decorrer destes anos.

Aos Profs. Dr. Pedro Antunes e Dr. César Valmor Rombaldi pelo auxílio no delineamento experimental do projeto que originou esta tese.

A todos os professores e funcionários do DCTA pela valiosa ajuda, sempre com prontidão e competência.

Em especial aos meus pais, **Nilo da Costa Gandra** e **Dulce Helena Avila Gandra**, e aos meus irmãos, **Prof. Dr. Edgar Avila Gandra** e **Designer Espencer Avila Gandra**, por serem a base fundamental da minha formação, onde sempre encontro apoio e incentivo para prosseguir. A vocês meu profundo agradecimento.

INDICE

LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
SUMÁRIO	xiii
SUMMARY	xv
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 OBJETIVOS	4
2 REVISÃO DE LITERATURA	5
2.1 STAPHYLOCOCCUS SPP.....	5
2.2 ESTAFILOCOCCOS COAGULASE POSITIVA	11
2.3 IDENTIFICAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO ENTRE ESTAFILOCOCCOS COAGULASE POSITIVA.....	13
2.5 MULTIPLEX PCR PARA IDENTIFICAÇÃO DE ESTAFILOCOCCOS COAGULASE POSITIVA.....	21
3 MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1 CEPAS BACTERIANAS	23
3.2 MEIOS DE CULTURA, SOLUÇÕES, REAGENTES E OUTROS.....	24
3.3 EQUIPAMENTOS.....	26
3.4 EXTRAÇÃO DE DNA	26
3.4.1 CULTURAS PURAS	26

3.4.2 AMOSTRAS DE LEITE	28
3.4.3 QUANTIFICAÇÃO DO DNA.....	28
3.5 AMPLIFICAÇÃO DE SEQUÊNCIAS DO GENE <i>NUC</i>	29
3.5.1 DESENHO DOS <i>PRIMERS</i>	29
3.5.2 MULTIPLEX PCR.....	30
3.5.3 VISUALIZAÇÃO E ANÁLISE DOS PRODUTOS AMPLIFICADOS	31
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
4.1 EXTRAÇÃO DE DNA	32
4.2 CULTURAS PURAS	36
4.2.1 ESPECIFICIDADE DO MPCR PARA <i>S. aureus</i> , <i>S. intermedius</i> E <i>S. hyicus</i> EM CULTURAS PURAS	36
4.2.2 LIMITE DE DETECÇÃO DO MPCR PARA <i>S. aureus</i> , <i>S.</i> <i>intermedius</i> E <i>S. hyicus</i> EM CULTURAS PURAS.....	40
4.3 AMOSTRAS DE ALIMENTOS.....	42
4.3.1 ESPECIFICIDADE DO MPCR PARA <i>S. aureus</i> , <i>S. intermedius</i> E <i>S. hyicus</i> EM LEITE BOVINO INTEGRAL ARTIFICIALMENTE CONTAMINADO.	42
4.3.2 LIMITE DE DETECÇÃO DO MPCR PARA <i>S. aureus</i> , <i>S.</i> <i>intermedius</i> E <i>S. hyicus</i> EM LEITE BOVINO INTEGRAL ARTIFICIALMENTE CONTAMINADO.	44
4.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	48
5 CONCLUSÕES.....	50
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Diferenciação bioquímica entre as espécies de <i>Estafilococos</i> coagulase positiva	16
TABELA 2: Oligonucleotídeos utilizados para identificação e diferenciação entre <i>S. aureus</i> , <i>S. intermedius</i> e <i>S. hyicus</i> , seqüência de bases, produtos de PCR estimados e espécies alvos.....	30
TABELA 3: Concentrações do DNA extraído a partir das concentrações microbianas seriadas das espécies <i>S. aureus</i> , <i>S. intermedius</i> e <i>S. hyicus</i> em culturas puras e em leite bovino integral artificialmente contaminado.	35
TABELA 4: Média das concentrações do DNA extraído a partir das concentrações microbianas seriadas das espécies <i>S. aureus</i> , <i>S. intermedius</i> e <i>S. hyicus</i> em culturas puras e em leite bovino integral artificialmente contaminado.	35

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1: DNAs após tratamento com RNase visualizados em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio, sob luz ultravioleta. 1- *S. aureus* FRI-100, 2 - *S. aureus* ATCC 29213, 3 - *S. hyicus* isolado clínico, 4 - *S. intermedius* isolado clínico, 5 - *E. coli* ATCC 11229, 6 – controle negativo (água ultrapura) e 7 - Padrão de peso molecular (100pb DNA Ladder). 32
- FIGURA 2: Média das concentrações de DNA obtidas a partir concentrações microbianas seriadas das espécies *S. aureus*, *S. intermedius* e *S. hyicus* em culturas puras e em leite bovino integral artificialmente contaminado..... 34
- FIGURA 3: Produtos de mPCR obtidos com os *primers* NUC1- NUC2, visualizados em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio, sob luz ultravioleta. 1 - *S. aureus* ATCC 10832, *S. aureus* ATCC 29213, 2 - *S. aureus* FRI-100, 3, 4 e 5 - *S. aureus*, isolados de origem clínica. 6 - controle negativo 1 (água destilada esterilizada), 7 -controle negativo 2 (*Staphylococcus epidermidis* ATCC 14990), 8 -controle negativo 3 (*Listeria monocytogenes* ATCC 764), 9 - padrão de peso molecular (100bp DNA Ladder)..... 36

FIGURA 4: Produtos de mPCR obtidos com os primers NUC3-NUC4 e NUC5-NUC6, visualizados em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio, sob luz ultravioleta. 1, 3 e 4 – Produtos de mPCR obtidos com isolados clínicos de *S. intermedius*, 5, 6 - Produtos mPCR obtidos com isolados clínicos de *S. hiycus*. 2 - controle negativo 1 (*E. coli* ATCC 11229), 7 - controle negativo 2 (*Listeria monocytogenes* ATCC 764), 8 -padrão de peso molecular (100bp DNA Ladder). 38

FIGURA 5: Produtos de mPCR obtidos com os primers NUC5-NUC6, visualizados em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio, sob luz ultravioleta. 1 – controle negativo 1 (*E. coli* 11229), 2 - controle negativo 2 (*Listeria monocytogenes* ATCC 764), 3 (temperatura de anelamento de 45°C), 4 (temperatura de anelamento de 50°C), 5 (temperatura de anelamento de 55°C), e 6 (temperatura de anelamento de 60°C) são produtos de mPCR obtidos com isolados clínicos de *S. intermedius*, 7 - padrão de peso molecular (2 Log DNA Ladder)..... 39

FIGURA 6: Produtos de mPCR obtidos com os *primers* NUC1-NUC2, NUC3-NUC4 e NUC5-NUC6, visualizados em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio, sob luz ultravioleta. 1 – controle negativo 1 (*E. coli* 11229), 2 - controle negativo 2 (*Listeria monocytogenes* ATCC 764), 3 – Produto de mPCR obtido a partir de isolado clínico de *S. intermedius*, 4 – Produto de mPCR obtido a partir de isolado clínico de *S. hiycus*, 5 - Produto de mPCR obtido com *S. aureus* ATCC 29213, 6 - controle negativo 3 (*E. coli* 11229), 7 - controle negativo 4 (água destilada esterilizada), 8 -padrão de peso molecular (100bp DNA Ladder). 40

FIGURA 7: Produtos de mPCR obtidos com DNA extraído a partir de concentrações seriadas de *S. aureus* ATCC 29213 amplificado com os *primers* NUC1- NUC2, visualizados em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio, sob luz ultravioleta. 1 - padrão de peso molecular (2log DNA Ladder), 2 - 10^5 UFC.mL⁻¹, 3 - 10^4 UFC.mL⁻¹, 4 - 10^3 UFCmL⁻¹, 5 - 10^2 UFCmL⁻¹, 6 - 50 UFCmL⁻¹, 7 -

- controle negativo 1 (*E. coli* 11229), 8 - controle negativo 2 (*Listeria monocytogenes* ATCC 764)..... 41
- FIGURA 8: Produtos de mPCR obtidos com DNA extraído a partir de concentrações seriadas de isolado clínico de *S. hiycus* amplificado com os *primers* NUC3- NUC4, visualizados em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio, sob luz ultravioleta. 1 - padrão de peso molecular (2log DNA Ladder), 2 - 10^5 UFC.mL⁻¹, 3 - 10^4 UFC.mL⁻¹, 4 - 10^3 UFCmL⁻¹, 5 - 10^2 UFCmL⁻¹, 6 - 50 UFCmL⁻¹, 7 - controle negativo 1 (*E. coli* 11229), 8 - controle negativo 2 (*Listeria monocytogenes* ATCC 764)..... 41
- FIGURA 9: Produtos de mPCR obtidos com DNA extraído a partir de concentrações seriadas de isolado clínico de *S. intermedius* amplificado com os *primers* NUC5- NUC6, visualizados em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio, sob luz ultravioleta. 1 - 10^5 UFC.mL⁻¹, 2 - 10^4 UFC.mL⁻¹, 3 - 10^3 UFC.mL⁻¹, 4 - 10^2 UFCmL⁻¹, 5 - 50 UFCmL⁻¹, 6 - controle negativo 1 (*E. coli* 11229), 7 - controle negativo 2 (*Listeria monocytogenes* ATCC 764), 8 - padrão de peso molecular (100bp DNA Ladder). 41
- FIGURA 10: Produtos de mPCR obtidos com os *primers* NUC1-NUC2, NUC3-NUC4 e NUC5-NUC6, visualizados em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio, sob luz ultravioleta. 1 – padrão de peso molecular, 2 - controle negativo 1 (*S. epidermidis* ATCC 14990), 3 - controle negativo 2 (*Listeria monocytogenes* ATCC 764), 4 – controle negativo 3 (*E. coli* 11229), 5 - controle negativo 4 (água destilada esterilizada). 6 - Produto de mPCR obtido a partir de leite contaminado com *S. aureus* ATCC 29213, 7 - Produto de mPCR obtido a partir de leite contaminado com isolado clínico de *S. hiycus*, 8 - Produto de mPCR obtidos a partir de leite contaminado com isolado clínico de *S. intermedius*..... 43
- FIGURA 11: Produtos de mPCR obtidos com DNA extraído de amostras de leite inoculado com concentrações seriadas de *S.aureus* ATCC 29213 amplificado com os *primers* NUC1- NUC2, visualizados em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio, sob luz

ultravioleta. 1 - 10^4 UFC.mL⁻¹, 2 - 10^3 UFCmL⁻¹, 3 - 10^2 UFCmL⁻¹, 4 - 50 UFCmL⁻¹, 5 - padrão de peso molecular (100bp DNA Ladder).. 45

FIGURA 12: Produtos de mPCR obtidos com DNA extraído de amostras de leite inoculado com concentrações seriadas de isolado clínico de *S. hiycus* amplificado com os *primers* NUC3- NUC4, visualizados em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio, sob luz ultravioleta. 1 - 10^4 UFC.mL⁻¹, 2 - 10^3 UFCmL⁻¹, 3 - 10^2 UFCmL⁻¹, 4 - 50 UFCmL⁻¹, 5 - padrão de peso molecular (100bp DNA Ladder).. 45

FIGURA 13: Produtos de mPCR obtidos com DNA extraído de amostras de leite inoculado com concentrações seriadas de isolado clínico de *S. intermedius* amplificado com os *primers* NUC5- NUC6, visualizados em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio, sob luz ultravioleta. 1 - 10^5 UFC.mL⁻¹, 2 - 10^4 UFC.mL⁻¹, 3 - 10^3 UFCmL⁻¹, 4 - 10^2 UFCmL⁻¹, 5 - 50 UFCmL⁻¹, 6 - controle negativo 1 (*E. coli* 11229), 7 - controle negativo 2 (*Listeria monocytogenes* ATCC 764), 8 - padrão de peso molecular (100bp DNA Ladder). 45

SUMÁRIO

GANDRA, ELIEZER AVILA.D.S., Universidade Federal de Pelotas, Março de 2006. **Multiplex PCR para detecção de *S. aureus*, *S. intermedius* E *S. hyicus* em leite.** Professor Orientador: Wladimir Padilha da Silva. Comitê de orientação: Maria Aparecida Fernandez (UEM), Jorge Adolfo Silva.

Staphylococcus aureus foi considerada, por muitos anos, a única espécie do gênero *Staphylococcus* com capacidade de produzir enterotoxinas e coagulase. Posteriormente, outras espécies com essas características, tais como *S. hyicus* e *S. intermedius*, foram identificadas. Estas três espécies apresentam-se morfológica e bioquimicamente, extremamente semelhantes, o que torna difícil sua diferenciação assim como sua identificação em alimentos através de técnicas fenotípicas de análise microbiológica. Dessa forma, este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de um multiplex PCR (mPCR) para a identificação de *S. aureus*, *S. intermedius* e *S. hyicus* diretamente em leite bovino integral. Foram utilizadas cepas padrão e isolados clínicos das espécies *Staphylococcus aureus*, *S. hyicus*, *S. intermedius*, *S. epidermidis*, *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli*, avaliando-se a especificidade e o limite de detecção do mPCR, tanto para bactérias em culturas puras como para amostras de leite UHT artificialmente contaminado. As amostras de DNA foram submetidas a amplificação, através de mPCR com seqüências do gene *nuc*, específicas para *S. aureus*, *S. intermedius* e *S. hyicus*, utilizando-se, simultaneamente, os *primers* NUC1-NUC2 (para seqüências do gene *nuc* de *S. aureus*), NUC3-NUC4 (para seqüências do gene *nuc* de *S. hyicus*) e NUC5-NUC6 (para seqüências do gene *nuc* de *S. intermedius*). O mPCR proposto possibilitou a identificação das espécies *S. aureus*, *S. hyicus* e *S. intermedius*, tanto em culturas puras, quanto diretamente em leite bovino integral, com especificidade adequada e limite de detecção aceitável para identificação de estafilococos coagulase positiva (ECP) em alimentos. A especificidade foi

comprovada pela amplificação de fragmentos espécie-específicos e o limite de detecção foi verificado através dos limiares de detecção obtidos para as três espécies: 10^3UFC.mL^{-1} para as espécies presentes em amostras de leite artificialmente contaminadas.

SUMMARY

GANDRA, ELIEZER AVILA.D.S., Universidade Federal de Pelotas, outubro de 2005. **Multiplex PCR for the detection of *S. aureus*, *S. intermedius* and *S. hyicus* in milk.** Adviser: Wladimir Padilha da Silva. Comit  : Maria Aparecida Fernandez (UEM), Jorge Adolfo Silva.

Staphylococcus aureus was considered, for many years, the only species of the *Staphylococcus* genus with capacity to produce enterotoxins and coagulase. Later, other enterotoxins and coagulase producing species, such as *S. hyicus* and *S. intermedius*, had been identified. These three species showed extremely similar morphologic characteristics, as well as biochemical reactions, what makes its differentiation and identification in food difficult through This work had as objective the development of a multiplex PCR (mPCR) for the identification of *S. aureus*, *S. intermedius* and *S. hyicus* directly in bovine milk. They had been used Standard and isolated strains of the *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *S. hyicus*, *S. intermedius*, *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* species, evaluating the specificity and the detention limit of mPCR, as much for bacteria in pure cultures as for artificially contaminated UHT milk samples. The DNA templates had been submitted the amplification, through mPCR with sequences of the *nuc* gene, specific for *S. aureus*, *S. intermedius* and *S. hyicus*, using simultaneously the primers NUC1-NUC2 (for sequences of the *S. aureus nuc* gene), NUC3-NUC4 (for sequences of the *S. hyicus nuc* gene) and NUC5-NUC6 (for sequences of the *S. intermedius nuc* gene). The mPCR considered, made possible the identification of *S. aureus*, *S. hyicus* and *S. intermedius* species, as much in pure cultures, how much directly in integral bovine milk, with adequate specificity and acceptable detention limit for identification of coagulase positive *Staphylococcus* (CPS) in foods. The specificity was proven by the amplification of species-specific fragments and the detention limit was verified through the gotten thresholds of detention for the three species: 10^3UFC.mL^{-1} for the species gifts in artificially contaminated milk samples.

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Staphylococcus* é formado por 40 espécies e 24 subespécies (Euzéby, 2006), das quais, *Staphylococcus aureus* é a mais relacionada a casos e a surtos de intoxicação alimentar, devido à capacidade da maioria de suas cepas de produzir enterotoxinas (Frazier & Westhoff, 1993; Jay, 1996; Silva *et al.* 2001). Ao longo dos anos são descritos na literatura inúmeros surtos de intoxicação alimentar causados pela ingestão de alimentos contendo enterotoxinas estafilocócicas pré-formadas (Crabtree & Litterer, 1934; Shaugnessy & Grubb, 1937; Caudil & Meyer, 1943; Minor & Marth, 1972; Minor & Marth, 1976; Galbraith *et al.*, 1982; Meehan *et al.*, 1992; Sabioni *et al.*, 1994; Passos *et al.*, 1996; Su & Wong, 1997; Kloos & Bannerman, 1999; Miwa *et al.*, 2001). Em função do risco à saúde pública que sua presença representa em alimentos, estabeleceu-se, em diversos países, inclusive no Brasil (Resolução RDC N° 12, de 2 de Janeiro de 2001), a obrigatoriedade de sua pesquisa e enumeração, como parte das ações de fiscalização sanitária de órgãos governamentais.

Por muitos anos *S. aureus* foi considerada a única espécie do gênero *Staphylococcus* capaz de produzir enterotoxinas, bem como de produzir coagulase, uma enzima extracelular que coagula o plasma sanguíneo, que é

muito utilizada na rotina laboratorial para identificação deste microrganismo (Kloos & Bannerman, 1999; Konemam et al., 2001).

Posteriormente, outras espécies produtoras de enterotoxinas e de coagulase, tais como *S. hyicus* e *S. intermedius*, foram identificadas e, inclusive, surtos de intoxicação alimentar já foram atribuídos a essas duas espécies (Valle et al., 1990; Khambati et al., 1994; Wandenesh et al., 1995; Jay, 1996). Em função destes fatores, bem como da grande semelhança fenotípica entre essas três espécies de *Staphylococcus*, houve uma mudança na legislação brasileira, que passou a estabelecer a pesquisa e enumeração de estafilococos coagulase positiva em alimentos ao invés da enumeração de *S. aureus* (Portaria. 451 de 19 de setembro de 1997, ANVISA; Resolução RDC N°12, de 2 de Janeiro de 2001, ANVISA).

Essas três espécies microbianas apresentam características morfológicas em meios de cultivo diferenciais, bem como reações bioquímicas, extremamente semelhantes, o que torna difícil sua diferenciação (Bandeira, 2001; Gandra 2003). Na rotina laboratorial, tanto em análises de alimentos quanto em análises clínicas, o teste de coagulase em tubo (coagulase livre) é o método padrão empregado para identificar e classificar *Staphylococcus* como coagulase positiva e, muitas vezes, o único teste utilizado para identificar em alimentos um isolado como sendo *S. aureus* (Downes & Ito, 2001; Silva et al., 2001). Entretanto, este procedimento não permite diferenciar *S. aureus* de *S. intermedius* nem de *S. hyicus* (Bandeira, 2001; Gandra 2003). Além disso, já foi comprovada a existência de cepas de *S. aureus* coagulase negativa (Matthews et al., 1997) e de *S. hyicus* com produção variável desta enzima (Kloos & Bannerman, 1999), fatos que permitem inferir sobre possibilidade de ocorrência de resultados falso negativos quando da utilização isolada do teste da coagulase livre para identificação desses patógenos em amostras alimentícias, evidenciando a necessidade de métodos mais eficazes para a detecção desses microrganismos em alimentos.

A competitividade entre empresas do setor alimentício torna fundamental a utilização de metodologias de resposta rápida para o controle da qualidade de matérias-primas, processos e de produtos acabados. Neste contexto os

métodos microbiológicos tradicionais de avaliação da presença de patógenos em alimentos tornam-se um fator limitante, principalmente pela necessidade de um elevado tempo de análise, demandando, em alguns casos, até uma semana para identificação em nível de gênero/espécie. No caso específico da detecção e quantificação de *Estafilococos* coagulase positiva em alimentos é demandado um tempo mínimo de 72 horas (Downes & Ito, 2001).

O desenvolvimento da tecnologia de DNA recombinante, bem como o advento da amplificação *in vitro* pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR – *Polymerase Chain Reaction*), a qual permite obter, rapidamente, grandes quantidades de cópias de um segmento específico do DNA, vieram potencializar métodos de análise baseados em seqüências de ácidos nucléicos. A aplicação dessas metodologias originou diversos estudos na busca de métodos mais rápidos e eficazes de identificação de microrganismos em alimentos (Boer & Beumer, 1999; Farber *et al.*, 2001; Konemam *et al.*, 2001; Malorny *et al.*, 2002).

Nos últimos anos vem sendo sugerida a utilização da amplificação por PCR de seqüências específicas do genoma microbiano para serem utilizadas como marcadores genéticos, tanto em nível de espécie como de sub-espécie, como uma alternativa viável aos métodos morfológicos e bioquímicos tradicionalmente utilizados (Farber *et al.*, 2001).

Para identificação de culturas puras de *S. aureus* já foram utilizados com sucesso, entre outros, o gene *coa*, que codifica a produção da coagulase (Silva *et al.*, 2003), o gene *spa*, que codifica produção da proteína A (Frénay *et al.*, 1996; Van Belkun *et al.*, 1997), o gene *mecA*, que codifica a resistência à antibióticos β -lactâmicos (Barski *et al.*, 1996; Nawas *et al.*, 1998; Loureiro *et al.*, 2000), as regiões espaçadoras entre os genes 16s e 23s do operon do RNA ribossômico (Gürtler & Barrie, 1995; Cuny *et al.*, 1996; Forsman *et al.*, 1997), e, mais recentemente, o gene *nuc*, que codifica a produção de endonucleases termoestáveis (Wakita *et al.*, 2002; Silva *et al.*, 2003; Baron *et al.*, 2004). Para identificação das demais espécies enterotoxigênicas de *estafilococos* coagulase positiva o número de estudos moleculares realizados

até o momento é notavelmente menor, quando comparado aos desenvolvidos para *S. aureus*.

Uma técnica molecular que vem sendo utilizada de maneira crescente nos últimos anos para identificação bacteriana é o multiplex PCR (-mPCR). Nessa técnica se utiliza mais de um par de *primers* na mesma reação, possibilitando a amplificação simultânea de mais de uma sequência de DNA e que mais de uma espécie bacteriana possa ser identificada através da mesma reação PCR, promovendo uma análise mais ampla, mais rápida e mais barata da presença de bactérias patogênicas em alimentos (Tang & Persing, 1999; Baron et al. 2004).

Na busca de métodos mais eficazes e mais rápidos para detecção e identificação de patógenos alimentares, neste trabalho é proposto o desenvolvimento de um mPCR com especificidade e limite de detecção adequados para a identificação de três espécies enterotoxigênicas de estafilococos coagulase positiva (ECP) de importância em alimentos: *S. aureus*, *S. intermedius* e *S. hyicus*.

1.1 OBJETIVOS

- a) desenvolver método mais rápido e específico para a detecção e identificação de três espécies enterotoxigênicas de estafilococos coagulase positiva diretamente em leite;
- b) avaliar a rapidez, especificidade e o limite de detecção de um mPCR, utilizando sequências espécie-específicas dos genes *nuc*, para a identificação das espécies *S. aureus*, *S. intermedius* e *S. hyicus* em culturas puras e em leite bovino integral.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 STAPHYLOCOCCUS SPP.

De acordo com o *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (1986), a família *Micrococcaceae* é composta por quatro gêneros: *Planococcus*, *Micrococcus*, *Stomatococcus* e *Staphylococcus*. Entretanto, estudos genéticos têm indicado que *Staphylococcus* está mais próximo de *Bacillus*, *Lactobacillus* e *Streptococcus* do que de *Micrococcus* ou *Stomatococcus* (Bascomb & Manafi, 1998).

A primeira descrição de bactérias do gênero *Staphylococcus* foi realizada por Ogoston em 1880 (apud Levy, 1997), que descreveu estes microrganismos como cocos em forma de cachos e responsáveis por infecções piogênicas. As primeiras espécies foram discriminadas através da produção de pigmentos: *S. aureus*, de cor amarelo dourado e *S. albus* com colônias brancas. Em 1974, Baird-Parker descrevia que apenas três espécies tinham importância clínica, utilizando como característica diferencial a prova da coagulase: a) coagulase-positiva - *S. aureus*; b) coagulase-negativa - *S. epidermidis* e *S. saprophyticus* (Baird-Parker, 1974). Atualmente, o gênero *Staphylococcus* é composto por 40 espécies e 24 subespécies (Euzéby, 2006).

As bactérias do gênero *Staphylococcus* são cocos Gram-positivos, com diâmetro variando entre 0,5 e 1,5 μm , imóveis e não formadores de esporos. Quando visualizadas em microscópio, aparecem em forma de cacho de uva, por se dividirem em planos diferentes, entretanto, dependendo da idade da colônia, podem ser encontradas isoladas, aos pares, agrupadas em tétrades ou, ainda, em pequenas cadeias. A maior parte das espécies apresenta metabolismo respiratório e fermentativo e têm capacidade de fermentar uma grande variedade de carboidratos, principalmente em condições de aerobiose, com produção final de ácido, mas não de gás (Sneath et. al., 1986; Kloos & Bannerman, 1999; Franco & Landgraf, 2002).

Os estudos relacionados aos fatores intrínsecos e extrínsecos que interferem na multiplicação destes microrganismos em alimentos foram realizados, em quase sua totalidade, com *S. aureus*, devido a esta ser a espécie mais relacionada a casos de intoxicação alimentar (Frazier & Westhoff, 1993; Jay, 1996; Silva et al. 2001). Jay (1996), por exemplo, relata que esta espécie é capaz de se multiplicar dentro de uma faixa de pH compreendida entre 4,0 e 9,8, com ótimo entre 6 e 7 e que apresentam temperatura de crescimento entre 7 a 47,8°C. Franco & Landgraf (2002) salientam que estes microrganismos apresentam tolerância a concentrações de 10 a 20% de NaCl, e a nitratos, e que têm capacidade de crescer em valores de atividade de água (Aa) de 0,86, apesar de, sob condições ideais, poderem se desenvolver em valores de Aa de até 0,83, sem, no entanto, produzir enterotoxinas.

As bactérias do gênero *Staphylococcus* secretam várias enzimas e toxinas as quais são responsáveis por uma diversidade de patologias, tanto em humanos quanto em animais que, segundo Novak (1999), podem ser didaticamente divididas em infecções e doenças causadas por toxinas. As infecções podem ser localizadas, como pústulas, furúnculos, impetigos, processos mais extensos e graves, como infecção pós-cirúrgica, osteomielite, pneumonia, endocardite, meningite, etc., ou disseminadas, como bacteremia e septicemia. As doenças causadas por toxinas também apresentam amplo espectro de manifestações clínicas, como celulite, síndrome da pele

escaldada, síndrome do choque tóxico e intoxicação alimentar (Arbuthnott et al., 1990; Corbella et al., 1997).

Em relação a alimentos, os estafilococos são importantes pelas seguintes razões: primeiro, porque sua presença pode indicar deficiência de processamento ou condições higiênicas inadequadas do processo; segundo, porque suas enterotoxinas, uma vez presentes no alimento, poderão causar intoxicação alimentar.

As enterotoxinas estafilocócicas (EE) são proteínas extracelulares com baixo peso molecular (25.000 a 30.000 daltons), hidrossolúveis, cuja composição em aminoácidos, estrutura molecular e atividades farmacológicas são semelhantes entre si, possuindo, entretanto, propriedades imunológicas distintas. Resistem à ação de enzimas proteolíticas, o que explica a capacidade de permanecerem ativas após sua ingestão, bem como em certos alimentos (Lopes, 1990; Lebeau et al., 1994; Martin & Myers, 1994; Silva, 1998; Novak, 1999). Uma característica relevante é a termoresistência das enterotoxinas, que são capazes de resistir a tratamentos térmicos como a pasteurização e a ultrapasteurização. Segundo Jay (1996) a produção de enterotoxinas geralmente está relacionada com cepas e/ou espécies de estafilococos que produzem as enzimas coagulase e termonuclease, entretanto, como ressalta o autor, algumas cepas e/ou espécies que não produzem coagulase e/ou termonuclease podem produzir enterotoxinas.

Tomando-se como base suas características antigênicas, as enterotoxinas são classificadas, atualmente, em enterotoxina estafilocócica A (EEA) (Casman, 1960); enterotoxina estafilocócica B (EEB) (Bergdoll et al., 1959); enterotoxina estafilocócica C (EEC) (Bergdoll et al., 1965); enterotoxina estafilocócica D (EED) (Casman et al., 1967); enterotoxina estafilocócica E (EEE) (Bergdoll et al., 1971), enterotoxina estafilocócica H (EEH) (Su & Wong, 1995), enterotoxina estafilocócica I (EEI) (Balaban & Rasooly, 2000), enterotoxina estafilocócica J (EEJ) (Balaban & Rasooly, 2000) enterotoxina estafilocócica K (EEK) (Balaban & Rasooly, 2000) e enterotoxina estafilocócica L (EEL) (Orwin et al., 2003). De acordo com Novak (1999), a EEC subdivide-se, segundo suas características imunológicas e pequenas diferenças de

propriedades físico-químicas, em três subtipos: EEC1 (Borja & Bergdoll, 1967); EEC2 (Avena & Bergdoll, 1967) e EEC3 (Reiser *et al.*, 1984). A maioria das cepas envolvidas em intoxicações alimentares produz EEA, sendo EEC, EEB, EED e EEE encontradas em ordem decrescente de frequência (Bergdoll, 1990; Silva, 1998).

Franco & Landgraf (2002), relatam que não existe uma concordância sobre a dose infectante capaz de causar sintomatologia em seres humanos, porém, de maneira geral, estima-se que esteja entre 0,015 e 0,375 μ g de enterotoxina por quilo de peso corpóreo. Jay (1996) relata que 200ng seriam suficientes para causar a enfermidade e Varnam & Evans (1991) (apud Silva, 1998) reportam que a quantidade mínima requerida para causar intoxicação tem sido estimada em 1 μ g/100g de alimento.

Os sintomas da intoxicação estafilocócica aparecem, em média, cerca de 4 horas após ingestão do alimento contaminado, podendo variar de 1 a 6 horas. Os principais sintomas são náusea, vômito, cólica abdominal, diarreia, sudorese, dor de cabeça e, algumas vezes, diminuição da temperatura corporal. Geralmente duram entre 24 e 48 horas e o índice de mortalidade é muito baixo (Tranter, 1990; Frazier & Westhoff, 1993; Jay, 1996; Franco & Landgraf, 2002).

Nos últimos anos a concentração mínima de *S. aureus* capaz de produzir enterotoxinas em doses patogênicas vem sendo relacionada a sistemas de regulação gênica. De acordo com Holloway (2004) a relação entre a quantidade de bactérias e a produção de toxinas em concentração suficiente para causar uma doença é fundamentada na regulação gênica dependente da densidade populacional, através da produção e liberação no meio externo de pequenas moléculas, chamadas de "auto-indutores" em um fenômeno denominado de *quorum sensing*. Ao encontro dessas afirmações, Winzer & Williams (2001) relatam que a relação entre patógenos e hospedeiros é fortemente afetada pela população bacteriana presente. Segundo Holloway (2004), 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, bactérias gram-positivas, como *Staphylococcus aureus*, usam 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 bem 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 (Holloway, 2004, Winzer & Williams, 2001). Podem ser citadas, 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* (Holloway, 2004, Winzer & Williams, 2001). A respeito disso Motta *et al.* (2001b) relatam que algumas enterotoxinas estafilocócicas têm sua síntese regulada através de um mecanismo de *quorum sensing* onde peptídeos atuam na ativação de um gene regulador acessório (gene *agr*). 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 ECP e suas enterotoxinas, em alimentos.

Além das enterotoxinas, algumas enzimas produzidas como fatores de virulência por determinadas espécies de estafilococos são utilizadas no diagnóstico laboratorial para identificação desse gênero microbiano ou de suas

espécies. Entre estas enzimas destacam-se a catalase, a termonuclease e a coagulase. A termonuclease ou endonuclease termoestável (TNase), é uma enzima que pode clivar DNA e RNA e que é produzida por *S. aureus*, *S. schleiferi*, *S. intermedius* e *S. hyicus*. Algumas cepas de *S. epidermidis*, *S. simulans* e *S. carnosus* demonstram uma fraca atividade de termonuclease (Hui et al., 1994, Kloos & Bannermam 1999).

Segundo Oliveira et. al. (1999) a termonuclease converte o ácido desoxirribonucléico (DNA) assim como o ácido ribonucléico (RNA) em fosfomonucleosídeos. Brakstad et. al. (1992) descrevem a termonuclease como uma proteína de massa molecular de 17.000 Daltons, capaz de degradar DNA e RNA, com atividade enzimática resistente a 100°C por um período de até uma hora.

Oliveira et. al. (1999) relatam que o melhor método para detecção desta enzima é o que consiste basicamente na utilização do meio de azul de toluidina com DNA em lâmina de microscopia ou em placas de petri, este método também é recomendado pela agência de proteção a saúde do Reino Unido (*Health Protection Agency* - HPA, 2004). Para isso culturas de estafilococos previamente crescidas em caldo infusão cérebro e coração de carneiro (*Brain Heart Infusion* – BHI), a uma temperatura de 37°C por 24 horas, devem ser aquecidas a 100°C em banho-maria por 30 minutos e, após resfriamento em temperatura ambiente e centrifugação a 3000g por 10 minutos, devem ser coletados as soluções sobrenadantes e colocadas em orifícios feitos no meio solidificado de azul de toluidina com DNA em câmara úmida. Como controle positivo deve ser utilizada e colocada em um dos orifícios da lâmina ou placa de petri uma cepa padrão de *S. aureus* previamente crescida em BHI (37°C, 24 horas). O teste é considerado positivo quando ocorrer o aparecimento de um halo cor de rosa de mais de 1mm ao redor dos orifícios, um em período em torno de 2 horas, demonstrando assim a presença da termonuclease.

Brakstad et. al. (1992) relatam que o teste da produção de termonuclease, utilizado comumente para identificação de *S. aureus* em diversos laboratórios, não é específico para esta espécie, porém, em ensaios

com anticorpos monoclonais para detecção de termonuclease de *S. aureus*, foram obtidos resultados espécie-específicos. Segundo os mesmos autores estes resultados encontrados em imunoensaios demonstram que a termonuclease de *S. aureus* possui seqüências genéticas espécie-específicas. Em concordância com Brakstad et al. (1992), Liebl et al. (1987) verificaram a especificidade para *S. aureus* de um fragmento clonado de uma seqüência do gene *nuc* com 518 pares de base em uma pesquisa para desenvolvimento de testes de hibridização em membranas.

2.2 ESTAFILOCOCOS COAGULASE POSITIVA

Entre as 40 espécies de estafilococos, cinco são capazes de produzir coagulase livre: *S. aureus*, *S. hyicus* (Devriese et al. 1978), *S. intermedius* (Hájek, 1976), *S. schleiferi* subesp. *coagulans* (Freney et al., 1988) e *S. delphini* (Varaldo et al., 1988). Dessas cinco espécies, três (*S. aureus*, *S. intermedius* e *S. hyicus*) foram descritas como produtoras de enterotoxinas e associadas a surtos de intoxicação alimentar. Além disso, essas três espécies apresentam outras semelhanças, como a capacidade de produzir a enzima termonuclease (Jay, 1996; Kloos & Bannerman, 1999; Konemam et al., 2001). Com relação às outras duas espécies coagulase positiva, não há relato de seu isolamento em alimentos nem de seu envolvimento em casos de intoxicação alimentar (Freney et al., 1988; Varaldo et al., 1988; Kloos & Bannerman, 1999; Konemam et al., 2001).

S. aureus é, sem dúvida, dentro do gênero *Staphylococcus*, a espécie mais relacionada a casos de intoxicação alimentar, sendo que numerosos surtos foram descritos e atribuídos a esse microrganismo (Crabtree & Litterer, 1934; Shaugnessy & Grubb, 1937; Caudil & Meyer, 1943; Minor & Marth, 1972; Minor & Marth, 1976; Galbraith et al., 1982; Meehan et al., 1992; Sabioni et al., 1994; Passos et al., 1996; Su & Wong, 1997; Kloos & Bannerman, 1999; Miwa

et al., 2001). É encontrado no meio ambiente e coloniza as pregas cutâneas, períneo, axilas e vagina de humanos e animais. Estima-se que esteja presente nas fossas nasais de 20% a 40% de humanos adultos saudáveis (Konemam et al., 2001). Por essa razão, os manipuladores de alimentos podem tornar-se portadores assintomáticos, possibilitando que esse microrganismo se dissemine dentro de plantas de processamento (Hajdenwurcel, 1998; Bandeira 2001). Dessa forma, sua presença em alimentos processados é interpretada como indicativa de contaminação dos manipuladores, bem como de limpeza e sanificação inadequadas de superfícies e de utensílios, materiais e equipamentos (ICMSF, 1985; Siqueira, 1995). Novak (1999) relata que *S. aureus* enterotoxigênicos podem ser carregados para os alimentos, durante ou após o processamento, através do manuseio inadequado e que a refrigeração insuficiente, possibilita o crescimento do microrganismo e a produção e liberação de enterotoxinas no alimento.

S. intermedius é considerado um microrganismo patogênico de interesse veterinário (Oliveira, 2000), encontrado como parte da microbiota da pele e de cavidades nasais e orais de cães, visons, equinos e gatos, que pode causar infecções cutâneas, urinárias, ósseas e do sistema nervoso central, em várias espécies animais (Jay, 1996; Konemam et al., 2001). Essa bactéria foi isolada a partir de feridas infectadas em seres humanos, causadas por mordeduras de cães, sendo também isolada em casos de mastite bovina (Bandeira, 2001; Konemam et al., 2001), embora a sua participação na etiologia da mastite ainda não tenha sido estabelecida e elucidada (Roberson et al., 1992). Segundo Jay (1996), *S. intermedius*, assim como *S. aureus*, apresenta a capacidade de produzir enterotoxinas. Em um estudo com 73 estafilococos isolados em cães, 52 foram identificados como *S. intermedius* e, destes, todos foram coagulase positiva e 13 foram enterotoxigênicos (Hirooka et al., 1988). Este microrganismo tem sido relacionado a vários surtos de intoxicação alimentar, principalmente em produtos de origem animal (Khambati et al., 1994; Wandenesh et al., 1995).

S. hyicus, assim como *S. intermedius*, é considerado um patógeno de interesse veterinário (Oliveira, 2000) encontrado, principalmente, em suínos e bovinos e tendo sido isolado, inclusive, no leite desta última espécie (Bandeira,

2001). Frequentemente, é associado à epiderme exudativa, uma doença aguda que acomete suínos lactentes e recém desmamados (Devriese *et al.*, 1978; Konemam *et al.*, 2001). Segundo Watts & Owens (1989) e Bandeira (2001), *S. hyicus*, juntamente com *S. aureus* é, muitas vezes, a bactéria predominantemente encontrada em rebanhos leiteiros com problemas de mastite. Jay (1996) ressalta a capacidade enterotoxigênica desta espécie de estafilococos, fato comprovado por Valle *et al.* (1990), que verificaram em cepas de *S. hyicus* coagulase positiva isoladas em ovinos, a produção de EEC. Da mesma forma, Adesiyun *et al.* (1984) e Hoover *et al.* (1983) verificaram cepas de *S. hyicus* que produziam EEA, EEB, EEC, EED e EEE.

2.3 IDENTIFICAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO ENTRE ESTAFILOCOCOS COAGULASE POSITIVA

A identificação de microrganismos patogênicos, como ECP, é importante tanto para o controle como para a prevenção de doenças alimentares (Franco & Landgraf 2002). Durante muitos anos associou-se a capacidade de produzir coagulase, termonuclease e enterotoxinas, apenas à *S. aureus*, por isso, os testes laboratoriais para pesquisa de estafilococos, assim como as legislações que estipulavam os limites para bactérias patogênicas em alimentos, eram direcionadas, especificamente, para esta espécie (Downes & Ito, 2001; Silva *et al.*, 2001). Nas últimas décadas, a metodologia de rotina para o isolamento, enumeração e identificação de *S. aureus* em alimentos utiliza, primeiramente, um ágar seletivo-diferencial, sendo o mais usado o ágar Baird-Parker (ABP), seguido da confirmação bioquímica da espécie através dos testes da coagulase livre e termonuclease (Matos *et al.*, 1995; Downes & Ito, 2001; Silva *et al.*, 2001). O teste da produção de coagulase livre é considerado padrão para a identificação de *S. aureus*, porém,

o teste da termonuclease é muito usado como auxiliar para discriminação entre *S. aureus* e outras espécies de estafilococos (Bascomb & Manafi, 1998).

A mudança no conceito de associar intoxicação alimentar estafilocócica apenas à *S. aureus* começou com a descoberta de que outras espécies, como *S. hyicus* e *S. intermedius*, apresentavam capacidade de produzir enterotoxinas. Além disso, esses três microrganismos produzem coagulase e termonuclease e suas colônias não apresentam diferenças acentuadas quando semeados em meios seletivos e diferenciais. Bandeira (2001), por exemplo, utilizou ABP para isolar estafilococos coagulase positiva, a partir de amostras de leite e pele de animais acometidos por mastite subclínica, concluindo que, nesse ágar, não foi possível diferenciar morfológicamente essas três espécies.

Hill (1983) e Hui *et al.* (1994), afirmam que a associação entre os testes de produção de termonuclease e de coagulase apresenta poder discriminatório suficientemente satisfatório para a rotina laboratorial e Bandeira (2001), descreve que a utilização concomitante dos testes de coagulase e de termonuclease aumentou a taxa de detecção de *S. aureus* em 30% em relação à utilização apenas do teste de coagulase. Deve-se salientar que, além da semelhança nas características bioquímicas e morfológicas entre estas três espécies, existem cepas atípicas de *S. aureus* que não produzem coagulase (Matthews *et al.*, 1997) e que *S. hyicus* apresenta produção variável desta enzima (Kloos & Bannerman, 1999). Isto sugere que apenas o isolamento em ABP, seguido dos testes da coagulase e termonuclease, pode não ser suficiente, nem para identificar e diferenciar as três espécies, nem para garantir a ausência destes microrganismos em alimentos.

Fatos como estes levaram à mudança da legislação brasileira, estabelecida pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) do Ministério da Saúde (MS): pela legislação vigente (Resolução RDC N°12, de 2 de Janeiro de 2001), são estipulados limites para presença de Estafilococos coagulase positiva em alimentos, enquanto que a anterior, (Portaria. 451 de 19 de setembro de 1997), estipulava parâmetros para contagens de *S. aureus*.

Avanços tecnológicos têm resultado em um grande número de testes bioquímicos e enzimáticos para identificação bacteriana. Além disso,

esquemas bioquímicos simplificados para identificação de espécies de estafilococos, têm sido desenvolvidos e avaliados para o uso laboratorial (Motta *et al.*, 2001a).

Diversos trabalhos que utilizam testes bioquímicos para discriminar estafilococos coagulase positiva de interesse em alimentos têm sido publicados. Roberson *et al.* (1992), Brito *et al.* (2002) e Gandra *et al.* (2005) buscaram determinar um número mínimo de testes fenotípicos que pudessem ser utilizados para identificar e diferenciar *S. aureus*, *S. intermedius* e *S. hyicus* e verificaram que os melhores seriam: crescimento em ágar P e ABP suplementados com acriflavina ($7\mu\text{g.mL}^{-1}$) e atividade da β -galactosidase. Capurro *et al.* (1999) sugerem que além destes testes, seria necessária a utilização do teste de hemólise em ágar chocolate. Raus & Love (1983) e Bascomb & Manafi (1998) relataram que a produção de acetoina, a produção de ácido a partir da maltose e a atividade da hialuronidase seriam os melhores testes para diferenciar *S. aureus* de *S. intermedius*. Em todos estes trabalhos verificou-se que quando os resultados eram analisados em conjunto era possível discriminar entre as três espécies, porém, na análise individual de cada teste, sempre era verificada uma pequena variabilidade em relação ao percentual de cepas de cada espécie com reação positiva ou negativa. As respostas esperadas de *S. aureus*, *S. intermedius* e *S. hyicus* aos principais testes bioquímicos de diferenciação estão expostas na Tabela 1.

TABELA 1: Diferenciação bioquímica entre as espécies de *Estafilococos* coagulase positiva

Espécie	Pig ^b	Coag ^c	Coa ^d	Tna ^e	Hem ^f	β-gal ^g	Acet ^h	Man ⁱ	Mal ^j	Man ^k	BPm ^l	Pm ^m	Hem ⁿ	Hia ^o
<i>S. aureus</i>	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+
<i>S. schleiferi</i>	-	-	+	+	(+)	(+)	+	-	-	ND	ND	ND	ND	ND
<i>subesp. schleiferi</i>	-	+	-	+	(+)	ND	+	d	-	ND	ND	ND	ND	ND
<i>S. intermedius</i>	-	+	D	+	d	+	-	(d)	(+)	-	-	-	-	-
<i>S. delphini</i>	-	+	-	-	+	ND	-	(+)	+	ND	ND	ND	ND	ND
<i>S. hyicus</i>	-	d	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+

^aSimbolos: +, ≥ 90% da espécie ou cepas são positivas; +/-, ≥ 90% da espécie ou cepas são fracamente positivas; -, ≥ 90% da espécie ou cepas são negativas; d, 11 a 89% das cepas são positivas; ND, não determinado; (), reação demorada.

^bProdução de pigmentos carotenóides.

^cProdução de coagulase livre.

^dProdução de coagulase ligada.

^eProdução de endonuclease termoestável (termonuclease ou TNase)

^fAtividade hemolítica em ágar sangue de carneiro 5%.

^gProdução de β-galactosidase.

^hProdução de acetoina.

ⁱFermentação aeróbica do manitol.

^jFermentação aeróbica da maltose.

^kFermentação anaeróbica do manitol.

^lCrescimento em ágar Baird-Parker modificado, suplementado com acriflavina (7µg.mL⁻¹).

^mCrescimento em ágar P modificado, suplementado com acriflavina (7µg.mL⁻¹).

ⁿAtividade hemolítica em ágar chocolate.

^oAtividade de hialuronidase.

Fonte: Adaptado de Roberson et al. (1992), Bascomb & Manafi (1998), Capurro et al. (1999), Kloos & Bannerman (1999).

Segundo Farber et al. (2001), os resultados de testes bioquímicos utilizados para identificação e biotipificação bacteriana podem apresentar variabilidade pela ação de fatores ambientais sobre a expressão gênica, além de outras desvantagens, como o baixo poder discriminatório em microrganismos com pequena variabilidade genética e o risco de interpretações e identificações errôneas, quando se utiliza um número limitado de testes. Entretanto, a utilização de um número grande de determinações, torna o custo da análise muito elevada.

Nos últimos anos verificou-se um aumento significativo no desenvolvimento de métodos genéticos para detecção e caracterização de bactérias patogênicas em alimentos. Dentre esses, destaca-se a amplificação de seqüências do DNA pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR, *Polymerase Chain Reaction*) (Boer & Beumer, 1999; Malorny et al., 2002). A reação em cadeia da polimerase é uma técnica altamente sensível, por meio da qual, pequenas quantidades de seqüências de DNA ou RNA específicas, podem ser enzimaticamente amplificadas a uma extensão tal, que uma quantidade suficiente de material fica disponível para alcançar o limiar do "sinal" para detecção (Konemam et al., 2001). Desenvolvida primeiramente por Kary B. Mullis em 1985, esta técnica permite obter milhões de cópias de um segmento específico de DNA através da ação da enzima *Taq* DNA polimerase e de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) sobre um DNA molde. É realizada em um equipamento automatizado e computadorizado, denominado de termociclador, que promove a alternância de temperaturas por determinados períodos de tempo, possibilitando a ocorrência de ciclos repetitivos de desnaturação e síntese do DNA (Konemam et al., 2001). Na última década o PCR tornou-se a técnica genética mais utilizada em diagnóstico microbiológico (Boer & Beumer, 1999; Malorny et al., 2002).

A introdução de PCR em diagnóstico microbiano estabeleceu uma alternativa viável às técnicas tradicionais de cultura (Malorny et al., 2002). Esta técnica apresenta diversas vantagens em relação aos métodos convencionais, como maior poder de tipificação e discriminação, maior rapidez, bom limite de detecção, maior seletividade, especificidade, potencial para automação e a

possibilidade de trabalhar com bactérias que não são cultiváveis em meios de cultura normalmente utilizados (Bush & Nitschko, 1999). Os principais obstáculos à sua implementação na rotina laboratorial são a incapacidade da técnica em diferenciar entre células vivas e células mortas, a presença de inibidores da enzima polimerase em alguns alimentos, o alto investimento em equipamentos e reagentes e a falta de aprovação, padronização e regulamentação por parte de organismos oficiais (Malorny *et al.*, 2002). Uma outra desvantagem está na complexidade da técnica, principalmente para ser utilizada em análises de rotina, apesar de que o recente desenvolvimento de kits baseados em PCR tem facilitado a sua utilização e difusão (Boer & Beumer, 1999).

Várias modificações da técnica de PCR básica foram descritas. Uma dessas modificações é a RT-PCR (*Reverse Transcriptase PCR*), desenvolvida para amplificar RNA, onde este é, primeiramente, convertido em DNA complementar (cDNA) pela ação de uma enzima transcriptase reversa (RT) e o cDNA é amplificado por PCR (Tang & Persing, 1999). Alguns exemplos de técnicas de amplificação baseadas em PCR são: *Nested PCR*, técnica na qual são realizados diversos ciclos de amplificação com um grupo de *primers* e o produto dessa amplificação é, então, amplificado, utilizando-se outro grupo de *primers* dirigidos para uma sequência que se encontra dentro da sequência amplificada pelo primeiro grupo de *primers* (Konemam *et al.*, 2001); RAPD PCR (*Random Amplified Polymorphic DNA*) ou AP-PCR (*Arbitrarily Primed PCR*), descritas, originariamente, por Welsh e McClelland em 1990, envolvem o uso de um *primer* único e pequeno (usualmente de 10 a 15 bases), arbitrariamente escolhido, para amplificar DNA genômico sob condições de baixa estrigência, não sendo necessário o conhecimento prévio da região de ligação do *primer* (Tang & Persing, 1999); o multiplex PCR (mPCR) onde se utiliza mais de um par *primers* por reação (Tang & Persing, 1999; Konemam *et al.*, 2001).

O aprimoramento de metodologias baseadas em PCR possibilitou a inserção dessas técnicas para a identificação e tipificação de microrganismos e, dependendo da especificidade de detecção desejada (gênero, espécie, subespécie), podem ser utilizadas diferentes regiões do genoma (Boer &

Beumer, 1999; Malorny *et al.*, 2002). A amplificação de seqüências genômicas conhecidas, conservadas, repetitivas e de consenso, denominadas de REP (*Repetitive Extragenic Palindromic*), ERIC (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus*) vem sendo utilizada de maneira crescente para identificação e tipificação bacteriana (Farber *et al.*, 2001). Outra técnica muito usada é a análise do polimorfismo do tamanho de fragmentos de restrição previamente amplificados por PCR (*Restriction Fragment Length Polymorphism*, PCR-RFLP), na qual fragmentos amplificados por PCR são submetidos a digestão com uma (ou mais) endonuclease de restrição específica, seguida de eletroforese em gel de agarose, para verificação do polimorfismo genético (Farber *et al.*, 2001). Nos últimos anos, o uso de PCR-RFLP vem sendo associado a eletroforese em campo pulsado (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*, PFGE), que é uma eletroforese realizada em uma cuba hexagonal ou ortogonal, podendo ter de 6 a 24 eletrodos, que permite uma separação mais efetiva dos fragmentos (Tang & Persing, 1999; Farber *et al.*, 2001; Konemam *et al.*, 2001). Farber *et al.* (2001) descrevem, também, outra técnica de identificação e tipificação bacteriana, denominada de PCR ribotipificação (*PCR Ribotyping*), que envolve a amplificação por PCR da região entre as seqüências conservadas 5s, 16s e 23s do operon do RNA ribossômico (rRNA), que está sendo muito utilizada para diferenciação entre espécies microbianas.

Diversos trabalhos de identificação, tipificação e subtipificação molecular de *S. aureus* têm sido desenvolvidos, utilizando metodologias variadas e analisando diferentes constituintes genéticos. Podem ser citados a análise do perfil plasmidial (Baumgartner *et al.*, 1984), o estudo de regiões variáveis do gene da coagulase (*coa*), utilizando, em alguns casos, RFLP-PCR, através de clivagem com a enzima de restrição *AluI* (Goh *et al.*, 1992; Schwarzkopf & Karch, 1994; Aarestrup *et al.*, 1995; Hookey *et al.*, 1998; Motta. *et al.*, 2001a). Também tem sido utilizada a análise de diversos genes como região X do gene da proteína A (*spa*) (Frénay *et al.*, 1996; Van Belkum *et al.*, 1997), a região entre 16s e 23s do operon do rRNA (Gürtler & Barrie, 1995; Cuny *et al.*, 1996) e o estudo do polimorfismo de fragmentos amplificados aleatoriamente (RAPD-PCR) (Matthews *et al.*, 1994; Fitzgerald *et al.*, 1997; Silva, 1998), entre outros.

Outra técnica utilizada na identificação e tipificação de *S. aureus* é a análise de fragmentos de restrição através de eletroforese em campo pulsado (PFGE) como foi demonstrado pelos trabalhos de Struelens *et al.* (1992), Schlichting *et al.* (1993), Bannerman *et al.* (1995) e Cuny *et al.* (1996). Diversas regiões conservadas presentes no genoma desta espécie de microrganismo têm sido utilizadas na sua caracterização como, por exemplo, o gene *gap*, utilizado por Yugueros *et al.* (2001). Nos últimos anos também têm sido desenvolvidos inúmeros trabalhos para a caracterização e identificação molecular de *S. aureus* resistentes a meticilina, utilizando, principalmente, RFLP e mPCR (Barski *et al.*, 1996; Nawas *et al.*, 1998; Loureiro *et al.*, 2000).

Forsman *et al.* (1997) utilizaram a amplificação de seqüências da região entre 16s e 23s do operon do rRNA para identificação e diferenciação entre *Staphylococcus* e *Streptococcus* causadores de mastite em bovinos. Tollersrud *et al.* (2000) utilizaram a hibridização, com sondas genéticas sintetizadas a partir de seqüências do gene da cápsula polissacarídica, para avaliar a detecção de cepas de *S. aureus* isoladas em bovinos.

Com relação às outras duas espécies coagulase positiva de interesse nesta pesquisa, o número de trabalhos utilizando métodos moleculares encontrados na literatura consultada é bem menor, quando comparado à *S. aureus*. Exemplos seriam os trabalhos de Khambaty *et al.* (1994) e de Morvan *et al.* (1997), que utilizaram PFGE para caracterizar cepas de *S. intermedius* implicadas em surtos de intoxicação alimentar, Takeuchi *et al.* (2000) que utilizaram PCR para pesquisar a presença do gene *Shpl*, que codifica para metaloproteases, em 58 cepas de *S. hyicus* isolados em lesões cutâneas (epiderme exudativa) de suínos, em cavidades nasais de suínos e de frangos e no leite da vacas acometidas de mastite, Drancourt & Raoult (2002) que desenvolveram uma PCR para seqüências do gene *rpoB*, que codifica a subunidade beta da RNA polimerase, para identificação de diversos isolados estafilocócicos entre eles *S. intermedius*, Pottumarthy *et al.* (2004) que diferenciaram cepas de *S. intermedius* de *S. aureus* resistentes a meticilina através da amplificação por PCR de seqüências dos genes *mecA* e da região 16S do rRNA, e o trabalho de Becker *et al.* (2005) que utilizaram o gene *nuc* para a identificação de *S. intermedius*, porém associando PCR e ELISA.

Em todos esses trabalhos ficou clara a aplicabilidade das técnicas moleculares para identificação de *Estafilococos* coagulase positiva, demonstrando ser uma alternativa viável aos métodos tradicionais. Apesar disso, um número muito limitado de trabalhos com metodologias baseadas em PCR, especificamente para detecção simultânea e diferenciação entre *S. aureus*, *S. hyicus* e *S. intermedius*, foram encontrados. Podem-se citar as pesquisas de Wakita *et al.* (2002), que desenvolveram um PCR para amplificação de seqüências da região 16s do operon do RNA ribossômico, de modo a identificar e diferenciar *S. intermedius*, de *S. aureus* e de *S. hyicus*; de Forsman *et al.* (1997) que diferenciaram *S. aureus* de *S. hyicus*, através de seqüências amplificadas da região entre 16s e 23s do operon do rRNA; e de Silva *et al.* (2003) que diferenciaram culturas puras de *S. aureus*, *S. hyicus* e *S. intermedius* através da amplificação de seqüências específicas dos genes *coa* e *nuc*.

2.5 MULTIPLEX PCR PARA IDENTIFICAÇÃO DE ESTAFILOCOCOS COAGULASE POSITIVA

Outra técnica molecular de interesse para o diagnóstico de microrganismos é o multiplex PCR, que utiliza mais de um par de *primers* na mesma reação, possibilitando a amplificação simultânea de diferentes seqüências de DNA (Tang & Persing, 1999). Esta técnica pode ser utilizada teoricamente para amplificar de modo simultâneo seqüências alvo de diferentes microrganismos patogênicos em uma única reação, tendo, portanto, potencial para ser utilizada na rotina laboratorial (Tang & Persing, 1999; Konemam *et al.*, 2001).

Segundo Henegariu *et al.* (1997), desde a sua primeira descrição em 1988, esta técnica tem sido utilizada com sucesso em diversos estudos

moleculares, incluindo análises de deleção, mutação e polimorfismos ou em estudos quantitativos com RT – PCR.

Experimentos delineados para a detecção e identificação de *S. aureus* presente em leite e derivados, utilizando mPCR, também foram encontrados na literatura consultada. Como exemplo, podemos citar as pesquisas de Tamarapu et al. (2001), que desenvolveram um mPCR para detecção de cepas de *S. aureus* diretamente em leite bovino e em queijo cheddar, através da amplificação de seqüências do gene *nuc* e do gene *entC*. Pesquisas utilizando técnicas moleculares visando discriminar entre as todas as espécies coagulase positiva são escassos na literatura. O único trabalho relatado no qual foram utilizadas seqüências espécies-específicas do gene *nuc* para discriminar *S. aureus* de *S. intermedius* de variadas origens foi descrito Baron et al. (2004).

Entretanto, para a discriminação simultânea e detecção direta em alimentos das três espécies alvo deste estudo, utilizando seqüências do gene *nuc* e mPCR não foram encontrados trabalhos na literatura consultada.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CEPAS BACTERIANAS

Foram utilizadas cepas padrão de *Staphylococcus aureus* (ATCC 10832, ATCC 29213 e FRI-100), isolados clínicos das espécies *S. hyicus* e *S. intermedius* previamente identificados em nível de espécie através de testes bioquímicos e moleculares (Gandra, 2003) e cepas padrão de *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 14990), *Listeria monocytogenes* (ATCC 764) e *Escherichia coli* (ATCC 11229). Todas as cepas pertencem ao banco de cepas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos (MICROBIAL), do Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial (DCTA), da Faculdade de Agronomia “Eliseu Maciel” (FAEM), da Universidade Federal de Pelotas (UFPel). Estas cepas foram mantidas em Ágar Conservação (Antoniollo, 2001), sob temperatura de refrigeração ($\leq 4^{\circ}\text{C}$), até o momento do uso.

3.2 MEIOS DE CULTURA, SOLUÇÕES, REAGENTES E OUTROS

- a) ágar Baird-Parker (ABP), Oxoid[®], suplementado com solução aquosa de telurito de potássio a 1% e de solução ovo-salina;
- b) ágar Trypticase de Soja (TSA), Merck[®];
- c) caldo Trypticase de Soja (TSB), Merck[®];
- d) solução tampão 10 X para PCR, sem magnésio, Pharmacia[®];
- e) solução 2,0 mM de cloreto de magnésio, Pharmacia[®];
- f) solução de 200 μ M de cada dNTP, Invitrogen[®];
- g) solução de *Taq* DNA polimerase, Pharmacia[®], 5U. μ L⁻¹,
- h) 1 μ M de cada um dos “*primers*” (sintetizados por Invitrogen),
- i) solução 0,5 X de tampão Tris Borato EDTA (TBE 0,5X), pH 8,0, 1L (Adaptado de Sambrook *et al.*, 1989),
 - 0,054 g.L⁻¹ de Tris base, Gibco BRL[®];
 - 0,027 g.L⁻¹ de Ácido Bórico, Fatec[®];
 - 98% (v/v) de água ultrapura estéril;
 - 2% (v/v) de Solução de EDTA 0,5M, pH 8,0, Pharmacia[®];
 - No momento do uso a solução foi diluída 10 vezes;
- h) solução de brometo de etídio, Pharmacia[®], 10 mg.mL⁻¹;
- i) solução corante (tampão de carga ou de amostra) para eletroforese a base de bromofenol e glicerol;
- j) solução tampão Tris-EDTA–A (TE-A), pH 7,8 (Matthews *et al.*, 1997),
 - 10mM Tris base, Gibco BRL[®];

- 5mM EDTA, Pharmacia[®];
- k) solução tampão Tris-EDTA-B (TE-B), pH 7,8 (Matthews et al., 1997);
 - 50mM Tris base, Gibco BRL[®];
 - 20mM EDTA, Pharmacia[®];
- l) solução tampão Tris-EDTA -C (TE-C), pH 7,5 (Matthews et al., 1997);
 - 10 mM Tris base, Gibco BRL[®];
 - 1,0 mM EDTA, Pharmacia[®];
- m) solução de tampão acetato, 20mM;
- n) solução de ácido acético, 20mM, Fatec[®];
- o) solução de acetato de sódio, 20mM, Sigma[®];
- p) solução de dodecil sulfato de sódio (SDS), Pharmacia[®], 20% (p/v) em TE-B;
- q) solução de lisostafina ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$) , Sigma[®] L-7386, em tampão acetato 20mM;
- r) solução de cloreto de sódio 5M, Fatec[®];
- s) fenol, Sigma[®];
- t) álcool etílico absoluto, Nuclear[®];
- u) solução de Proteinase K, Sigma[®], 20mg.mL^{-1} ;
- v) agarose ultrapura, invitrogen[®];
- x) padrões de peso molecular, 2Log DNA Ladder e 100bp DNA Ladder, Invitrogen[®];
- y) RNase A, England Biolabs[®], 20 mg.mL^{-1} .

3.3 EQUIPAMENTOS

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

3.4 EXTRAÇÃO DE DNA

3.4.1 CULTURAS PURAS

Tanto para a avaliação da especificidade, quanto do limite de detecção do mPCR com culturas puras, a extração do DNA cromossomal das cepas foi realizada, com pequenas modificações, de acordo com o protocolo proposto por Matthews et al. (1997).

Para a avaliação da especificidade transferiu-se uma alçada carregada com uma cultura proveniente de ágar Baird-Parker (cepas identificadas como ECP) após incubação a 37°C por 48 horas ou de TSA (demais cepas), após incubação a 37°C por 24 horas, para 100µL de tampão TE-A. Para a avaliação do limite de detecção transferiu-se 100µL de solução obtida a partir de 5 concentrações (50 , 10^2 , 10^3 , 10^4 e 10^5 UFC.mL⁻¹) das três espécies de ECP provenientes de crescimento em meio TSB (37°C por 24 horas), quantificadas a partir de semeadura em ágar Baird-Parker a 37°C por 48 horas, para 100µL de tampão TE-A.

A lise celular iniciava-se pela adição de 100µL de lisostafina e incubação por 45 minutos a 37°C. Para completar a lise celular adicionava-se, em seqüência, 20µL de tampão TE-B contendo 20% de SDS e 3µL de proteinase K e incubava-se por uma hora a 37°C. Adicionava-se, então, 200µL de NaCl 5M e agitava-se, manualmente, por 15 segundos. Separava-se o material intracelular através de centrifugação a 10.000g por 15 minutos a 4°C e transferia-se o sobrenadante para um novo microtubo. Após, adicionava-se fenol-clorofórmio (1:1) seguido de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) para liberação e separação de proteínas, cuja etapa foi completada através de centrifugação a 10.000g por 15 minutos e transferência do sobrenadante para um novo microtubo.

A precipitação do DNA foi realizada com 800µL de álcool etílico absoluto, gelado. Após, foi realizada nova centrifugação a 10.000g por 15 minutos a 4°C, mantendo-se o *pellet* formado em 100µL de tampão TE-C. Para aumentar a pureza do material extraído incubava-se a 42°C por 40 minutos com RNase A (20 g.mL⁻¹) e lavava-se o *pellet* duas vezes com álcool etílico 70% colocando-se, logo após, para secar a temperatura ambiente durante aproximadamente 30 minutos. Após, ressuspensava-se o *pellet* com 30µL de tampão TE-C. A extração de DNA de cada cepa foi realizada, no mínimo, duas vezes, com cultivos de dias diferentes, sendo todas as amostras de DNA submetidas a amplificação por mPCR.

3.4.2 AMOSTRAS DE LEITE

Foram utilizadas amostras de 1mL de leite UHT (submetido ao processo térmico Ultra High Temperature) integral. Para o experimento de avaliação da especificidade do mPCR, essas amostras foram artificialmente, e separadamente, inoculadas com uma alçada carregada de cultura proveniente de ágar Baird-Parker (cepas identificadas como ECP) após incubação a 37°C por 48 horas, tendo a extração de DNA sido realizada imediatamente após a inoculação. Já para a avaliação do limite de detecção, assim como no caso da extração de DNA das culturas isoladas, as amostras foram contaminadas com 100µL de solução bacterina obtida a partir de 5 concentrações seriadas das três espécies de ECP provenientes de crescimento em meio TSB (50, 10², 10³, 10⁴ e 10⁵ UFC.mL⁻¹), quantificadas a partir de semeadura em ágar Baird-Parker após incubação a 37°C por 48 horas. A extração do DNA genômico foi realizada, com algumas modificações, de acordo com os protocolos propostos por Matthews *et al.* (1997) e de Meiri-Bendek *et al.* (2002).

Primeiramente 1mL das amostras de leite já contaminadas foram submetidas a centrifugação a 14000 rpm por dois minutos e o sobrenadante foi descartado. Realizou-se, então, a lavagem do *pellet* obtido com 100µL de solução de tampão TE-A até uma solução transparente ser obtida (Meiri-Bendek *et al.*, 2002). Após, adicionou-se 100µL de Lisostafina e, a partir desse ponto, procedeu-se de modo idêntico ao protocolo descrito para culturas isoladas, conforme proposto por Matthews *et al.* (1997).

3.4.3 QUANTIFICAÇÃO DO DNA

As amostras de DNA utilizadas para avaliar a especificidade da técnica foram quantificadas e padronizadas quanto a sua concentração (20ng). As

amostras utilizadas para verificação do limite de detecção também foram quantificadas, porém, utilizou-se na concentração em que foram extraídas. Para quantificação do DNA, realizou-se a leitura da densidade ótica (DO) através da absorbância em dois comprimentos de onda, 260 e 280nm. Quando a relação entre as duas leituras era igual ou superior a 1,8 e inferior ou igual a 2,0, determinava-se a concentração do DNA utilizando a relação: $DO_{260}=1,0$ corresponde a 50 µg de DNA (Sambrook *et al.*, 1989).

Foi realizada análise estatística através de uma análise de variância seguida do teste de Tuckey ao nível de significância de 5% para verificar se existiam diferenças significativas entre a quantidade de DNA extraída a partir das culturas puras e as amostras extraídas a partir do leite artificialmente contaminado.

3.5 AMPLIFICAÇÃO DE SEQUÊNCIAS DO GENE *nuc*

3.5.1 DESENHO DOS *PRIMERS*

Para identificação e diferenciação molecular de *S. aureus*, *S. intermedius* e *S. hyicus*, foram desenhados *primers*, utilizando o software Vector NTI INC. Os oligonucleotídeos foram baseados em seqüências completas do gene *nuc*, específicos para cada uma das três espécies de estafilococos, obtidas no GenBank/NCBI (número de acesso NC_002745 para *S. aureus*, L23973 para *S. hyicus* e X67678 para *S. intermedius*). As seqüências selecionadas foram alinhadas entre si e com os genes de outras espécies utilizando o software Blast (GenBank/NCBI) para se verificar a homologia entre os três genes. Os

primers foram desenhados de forma a anelarem nas regiões não homólogas, para garantir especificidade e possibilitar amplificações espécie-específicas.

A escolha do gene *nuc* foi baseada no fato das três espécies em estudo serem comprovadamente produtoras da enzima termonuclease e, por sua vez, carreadoras desse gene, bem como pela elevada correlação entre este e a produção de enterotoxinas estafilocócicas (Barski *et al.*, 1996). A sequência dos oligonucleotídeos (*primers*) utilizados, assim como o produto de amplificação estimado e a espécie alvo são mostrados na Tabela 2.

TABELA 2: Oligonucleotídeos utilizados para identificação e diferenciação entre *S. aureus*, *S. intermedius* e *S. hyicus*, sequência de bases, produtos de PCR estimados e espécies alvo.

<i>Primer</i>	Seqüência 5' - 3'	Produto de amplificação (pb)	Espécie (n° Genbank)
NUC1	ATGAAGTCAAATAAATCGCT	458	<i>S. aureus</i>
NUC2	TTTGGTGAAAAATACTTCTC		(NC_002745)
NUC3	AAAAATAACAACAGGATTGA	270	<i>S. hyicus</i>
NUC4	GTAAAGTCTGAAGCTTCTTT		(L23973)
NUC5	GAAAAAAATTACAACAGGCG	106	<i>S. intermedius</i>
NUC6	CACATCCGTTGAAGACTTTT		(X67678)

3.5.2 MULTIPLEX PCR

As soluções de reação foram preparadas contendo 1µL do DNA de cada bactéria (20nM) para a verificação da especificidade, ou 1µL de solução de DNA, extraído a partir de 5 concentrações seriadas em TSB (50, 10², 10³, 10⁴

e 10^5 UFCmL⁻¹), de cada uma das espécies microbianas, para o experimento de avaliação do limite de detecção da técnica. Foram adicionados, ainda, 1μM de cada *primer* (Tabela 2), utilizando-se os três pares de *primers* em todas as reações (mPCR), 200 μM de cada desoxinucleotídeo trifosfato (dNTP, Invitrogen), 1U de Taq Polimerase (Invitrogen, 5U.μL⁻¹), 2,0mM de MgCl₂ (Invitrogen) e 4μL do tampão 10X (Invitrogen), perfazendo um volume total de 40μL. O programa de PCR utilizado foi adaptado da metodologia proposta, primeiramente, por Goh *et al.* (1992) e modificada por Aarestrup *et al.* (1995) e Motta *et al.* (2001a). Consistia de 2 min a 94°C, 2 min a 55°C e 3 min a 72 °C por 40 ciclos. Após a termociclagem os tubos foram mantidos a -20°C até a execução da eletroforese.

3.5.3 VISUALIZAÇÃO E ANÁLISE DOS PRODUTOS AMPLIFICADOS

Imediatamente antes da aplicação no gel de agarose, os produtos de mPCR foram descongelados e foi retirada uma alíquota de 10μL à qual foi adicionado 2μL de tampão de carga. Para separação dos produtos amplificados foi realizada eletroforese (150 V, 80 mA, 50 min) em gel de agarose 1% (p/v) em tampão TBE, pH 8,4, corado com 0,5μg.mL⁻¹ de brometo de etídio (Dillon *et al.*, 1985 apud Silva, 1998). Juntamente com os produtos de PCR, aplicou-se no gel um padrão de peso molecular (2Log DNA Ladder ou 100bp DNA Ladder). A visualização das bandas no gel e a fotodigitalização foram realizadas sob transiluminação com luz ultravioleta, sendo o tamanho dos fragmentos amplificados verificado através de comparação visual com os padrões de peso molecular.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 EXTRAÇÃO DE DNA

Tanto na extração de DNA de culturas puras como a partir de amostras de leite, o DNA obtido apresentava grande quantidade de RNA o que tornou necessário o tratamento de todas as amostras com RNase antes de sua utilização como molde para o mPCR. Produtos da extração de DNA de culturas isoladas após tratamento com RNase são mostrados na Figura 1.



FIGURA 1: DNAs após tratamento com RNase visualizados em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio, sob luz ultravioleta. 1- *S. aureus* FRI-100, 2 - *S. aureus* ATCC 29213, 3 - *S. hyicus* isolado clínico, 4 - *S. intermedius* isolado clínico, 5 - *E. coli* ATCC 11229, 6 – controle negativo (água ultrapura) e 7 - Padrão de peso molecular (100pb DNA Ladder).

Neste estudo, a extração de DNA das amostras de leite foi realizada de acordo com os protocolos propostos por Matthews *et al.* (1997) e Meiri-Bendek *et al.* (2002). Esta escolha foi realizada pelo fato dos primeiros autores citados, assim como outros (Silva, 1998; Gandra, 2003), terem utilizado com sucesso essa técnica em estudos moleculares aplicados a ECP, e pelo fato do protocolo proposto por Meiri-Bendek *et al.* (2002) ter se mostrado adequado para extração de DNA de microrganismos Gram positivos diretamente em amostras de leite.

As amostras de DNA utilizadas para avaliação da especificidade tiveram sua concentração de DNA corrigida para 20nM antes da sua utilização no mPCR. Já as amostras utilizadas no estudo do limite de detecção não tiveram sua concentração modificada, porém, quantificou-se a concentração de DNA presente em cada uma das amostras, como pode ser verificado nas Tabelas 3 e 4 e na Figura 2. Verificou-se que a quantidade de DNA presente nas amostras obtidas a partir de leite sempre foi menor que a quantidade obtida a partir das culturas puras, e esta diferença foi estatisticamente significativa ($p = 008420$).

Um dos fatores que pode ter contribuído para essa diferença está no fato que matrizes alimentícias, em alguns casos, podem diminuir a eficiência de métodos enzimáticos em geral, principalmente pela presença de inibidores naturais no alimento (Rossen *et al.*, 1992; Tamarapu *et al.*, 2001). Como a técnica de extração utilizada neste estudo foi fundamentada na ação de duas enzimas (Lisostafina e Proteinase K), essa interferência pode ter ocorrido.

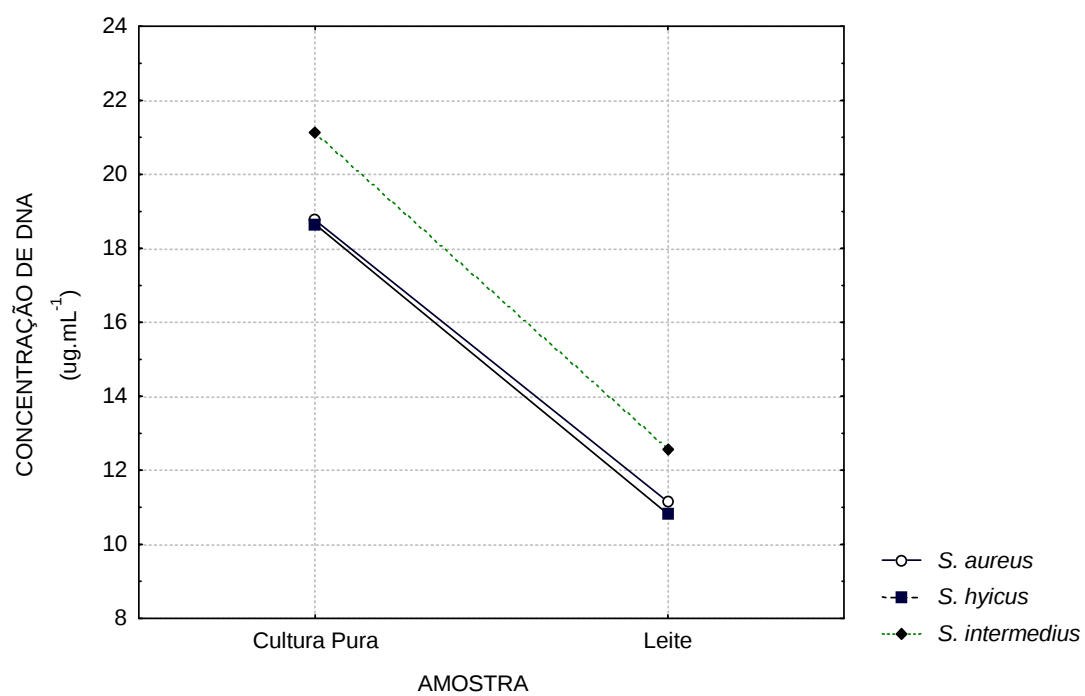


FIGURA 2: Média das concentrações de DNA obtidas a partir das concentrações microbianas seriadas das espécies *S. aureus*, *S. intermedius* e *S. hyicus* em culturas puras e em leite bovino integral artificialmente contaminado.

TABELA 3: Concentrações do DNA extraído a partir das concentrações microbianas seriadas das espécies *S. aureus*, *S. intermedius* e *S. hyicus* em culturas puras e em leite bovino integral artificialmente contaminado.

Concentração Microbiana (UFC.mL ⁻¹)	Concentração de DNA (µg.mL ⁻¹)																	
	<i>S. aureus</i>						<i>S. hyicus</i>						<i>S. intermedius</i>					
	Cultura Pura			Leite			Cultura Pura			Leite			Cultura Pura			Leite		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
50	1,2	0,9	0,4	0,5	0,2	0,3	1,4	1,6	1,3	0,4	0,2	0,5	1,5	1,9	1,2	0,3	0,9	0,8
10 ²	7,0	6,3	5,6	1,4	2,5	1,0	5,2	8,0	4,6	1,2	0,9	1,5	6,3	7,9	6,4	1,2	2,0	1,4
10 ³	14,0	15,2	13,1	5,9	8,0	9,9	12,6	16,2	11,4	6,4	6,0	9,0	13,4	14,5	17,8	6,7	9,0	7,2
10 ⁴	35,2	28,2	32,0	16,0	18,2	20,0	27,0	32,0	27,2	18,0	12,0	17,0	37,2	37,0	33,8	18,1	23,2	20,0
10 ⁵	45,0	39,2	38,1	28,2	26,7	28,4	42,0	46,0	43,2	30,0	28,2	31,0	50,1	46,1	42,1	30,1	33,4	34,1

TABELA 4: Média das concentrações do DNA extraído a partir das concentrações microbianas seriadas das espécies *S. aureus*, *S. intermedius* e *S. hyicus* em culturas puras e em leite bovino integral artificialmente contaminado.

Concentração Microbiana (UFC.mL ⁻¹)	Média da Concentração de DNA (µg.mL ⁻¹)					
	<i>S. aureus</i>		<i>S. hyicus</i>		<i>S. intermedius</i>	
	Cultura Pura	Leite	Cultura Pura	Leite	Cultura Pura	Leite
50	0,83	0,33	1,43	0,34	1,53	0,67
10 ²	6,30	1,63	5,93	1,20	6,87	1,53
10 ³	14,10	7,93	13,40	7,13	15,23	7,63
10 ⁴	31,80	18,07	28,73	15,67	36,00	20,43
10 ⁵	40,77	27,77	43,73	29,73	46,10	32,53

4.2 CULTURAS PURAS

4.2.1 ESPECIFICIDADE DO mPCR PARA *S. aureus*, *S. intermedius* E *S. hyicus* EM CULTURAS PURAS

Verificou-se que os *primers* NUC1 e NUC2 demonstraram especificidade para *S. aureus*, pois nas reações em que o DNA dessa espécie foi utilizado, obteve-se a amplificação do fragmento estimado de 458 pares de base, mesmo na presença dos demais conjuntos de *primers* testados no mPCR (Figuras 3 e 6). Inicialmente foram verificadas bandas inespecíficas em algumas amostras (Figura 3) o que demonstrou a necessidade de uma otimização, principalmente em relação à temperatura de anelamento.

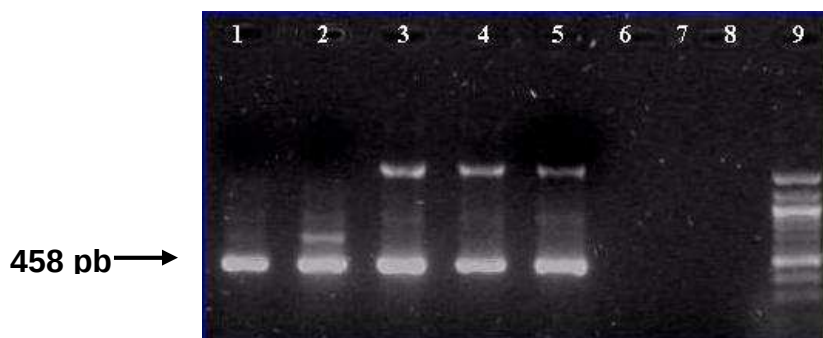


FIGURA 3: Produtos de mPCR obtidos com os *primers* NUC1- NUC2, visualizados em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio, sob luz ultravioleta. 1 - *S. aureus* ATCC 10832, 2 - *S. aureus* FRI-100, 3, 4 e 5 - *S. aureus*, isolados de origem clínica. 6 - controle negativo 1 (água destilada esterilizada), 7 -controle negativo 2 (*Staphylococcus epidermidis* ATCC 14990), 8 -controle negativo 3 (*Listeria monocytogenes* ATCC 764), 9 - padrão de peso molecular (100bp DNA Ladder).

Em acordo com estes resultados, Kim *et al.* (2001) também verificaram que fragmentos do gene *nuc* foram específicos para detecção de *S. aureus* diretamente em leite mastítico.

Maes *et al.* (2002), visando diferenciar *S. aureus* de Estafilococos coagulase negativa em amostras de sangue, utilizaram 169 isolados clínicos e cepas de referência, e compararam métodos fenotípicos de caracterização e identificação (teste da coagulase, kit comercial Pastorex Staph Plus -Sanofi Diagnostics Pasteur e ID 32 Staph system - Biomérieux) com PCR de seqüências dos genes *nuc*, *mec A* e a seqüência 16S do rRNA. Esse autores verificaram 100% de concordância entre os resultados de identificação bacteriana utilizando o gene *nuc* e os métodos fenotípicos, e 98% entre esses últimos e os encontrados com o gene *mec A* e com a seqüência 16S do rRNA, reiterando o potencial de utilização do gene *nuc* para a identificação de espécies estafilocócicas.

Os *primers* NUC3 e NUC4 demonstraram ser específicos para *S. hyicus*, pois, assim como no caso dos *primers* NUC1 e NUC2 para *S. aureus*, houve amplificação do fragmento estimado (270 pb) apenas quando o DNA de *S. hyicus* foi utilizado (Figura 4 e 6).

A potencialidade do gene *nuc* como marcador molecular específico para *S. hyicus* também foi verificada por Silva *et al.* (2003), que diferenciaram essa espécie de *S. aureus* e de *S. intermedius* através de sua amplificação por PCR.

Outros estudos genético moleculares foram desenvolvidos com *S. hyicus*. Forsman *et al.* (1997) construíram *primers* para detectar polimorfismos interespecíficos no espaço entre as regiões 16s e 23s do operon do rRNA, conseguindo diferenciar *S. hyicus* de outras oito espécies causadoras de mastite bovina, entre elas *S. aureus*. Matthews & Oliver (1994) desenvolveram um PCR para diferenciar espécies de estafilococos isoladas em bovinos, utilizando um único *primer*, denominado de 8.6d, e diferenciaram *S. hyicus* de outras 7 espécies estafilocócicas, porém, em nenhum desse últimos trabalhos citados, assim como nas demais pesquisas encontradas na literatura consultada, foram utilizadas seqüências do gene *nuc* para diferenciar *S.*

hyicus de *S. aureus* e de *S. intermedius*, demonstrando ser uma nova alternativa para estudos moleculares com esta espécie microbiana.

Verificou-se, também, uma grande variabilidade no tamanho dos fragmentos amplificados obtidos inicialmente com os *primers* NUC5 e NUC6 para o DNA de *S. intermedius*, entretanto, o fragmento estimado (106 pb) foi obtido sempre que o DNA dessa espécie microbiana foi submetido a amplificação (Figuras 4 e 6). O polimorfismo inicialmente verificado estava relacionado as condições de PCR utilizadas, as quais, provavelmente, estavam possibilitando amplificações inespecíficas e/ou poderiam estar permitindo que os *primers* ligassem a outros genes com seqüências similares ou parcialmente homólogas.

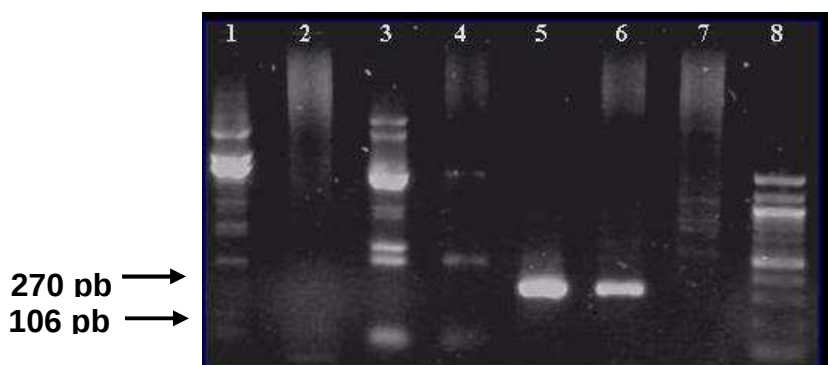


FIGURA 4: Produtos de mPCR obtidos com os *primers* NUC3-NUC4 e NUC5-NUC6, visualizados em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio, sob luz ultravioleta. 1, 3 e 4 – Produtos de mPCR obtidos com isolados clínicos de *S. intermedius*, 5, 6 - Produtos mPCR obtidos com isolados clínicos de *S. hyicus*. 2 - controle negativo 1 (*E. coli* ATCC 11229), 7 - controle negativo 2 (*Listeria monocytogenes* ATCC 764), 8 -padrão de peso molecular (100bp DNA Ladder).

Becker et al. (2005) desenvolveram uma PCR para amplificar seqüências do gene *nuc* para a detecção de *S. intermedius* a qual apresentou especificidade de 94% em 295 isolados clínicos provenientes de humanos e animais. Esses autores também relataram a presença de bandas inespecíficas em parte das amplificações. Resultados similares foram obtidos por Silva et al. (2003), que também verificaram polimorfismo utilizando *primers* similares, para diferenciar *S. intermedius* de *S. aureus* e de *S. hyicus*

A fim de otimizar a reação mPCR, principalmente para *S. intermedius* (*primers* NUC5-NUC6), foram testadas diferentes temperaturas de ligação (anelamento) dos *primers*, concluindo-se que a melhor temperatura foi de 55°C, a qual foi adotada como padrão durante a amplificação no mPCR proposto para culturas puras. Essa mesma temperatura foi utilizada com sucesso por Baron *et al.* (2004), que, assim como neste estudo, utilizaram seqüências espécie-específicas do gene *nuc* e conseguiram uma discriminação de 100% entre 44 cepas de *S. aureus* e 57 cepas de *S. intermedius* de variadas origens. A Figura 5 apresenta os resultados obtidos na determinação da temperatura ótima de anelamento para o mPCR.

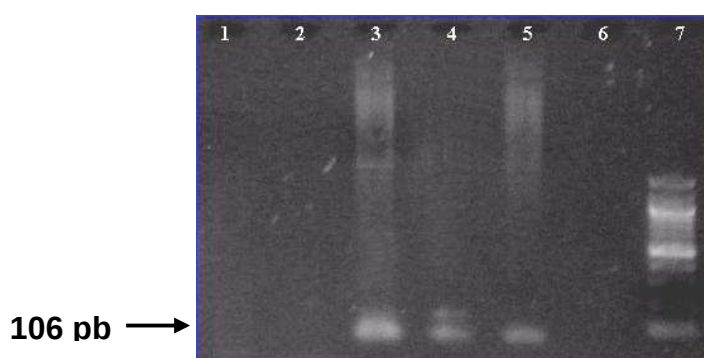


FIGURA 5: Produtos de mPCR obtidos com os *primers* NUC5-NUC6, visualizados em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio, sob luz ultravioleta. 1 – controle negativo 1 (*E. coli* 11229), 2 - controle negativo 2 (*Listeria monocytogenes* ATCC 764), 3 (temperatura de anelamento de 45°C), 4 (temperatura de anelamento de 50°C), 5 (temperatura de anelamento de 55°C), e 6 (temperatura de anelamento de 60°C) são produtos de mPCR obtidos com isolados clínicos de *S. intermedius*, 7 - padrão de peso molecular (2 Log DNA Ladder).

A necessidade de otimizar temperaturas de anelamento também foi relatada por Sánchez *et al.* (2003), os quais desenvolveram duas reações mPCR para a detecção de cepas de *Staphylococcus aureus* enterotoxigênicas: uma para detecção simultânea de cepas enterotoxigênicas do tipo A (*sea*), tipo B (*seb*), e do tipo E (*see*) e, outra para detecção simultânea de cepas enterotoxigênicas do tipo C (*sec*) e do tipo D (*sed*). Para ambas as reações foi necessário testar diversas temperaturas de anelamento até estabelecer as mais apropriadas. Os mesmos autores, assim como Hughes *et al.* (1997) reportam que baixas temperaturas de anelamento podem originar

reações com pouca especificidade devido a competição entre produtos não específicos pelos componentes da reação.

Barski *et al.* (1996), da mesma forma, relatam que as condições de reação em um mPCR devem ser otimizadas, a fim de que todas as seqüências alvo sejam satisfatoriamente amplificadas e que, para um anelamento adequado dos *primers*, são necessárias temperaturas mais elevadas reduzindo a possibilidade de ocorrência de amplificações não específicas.

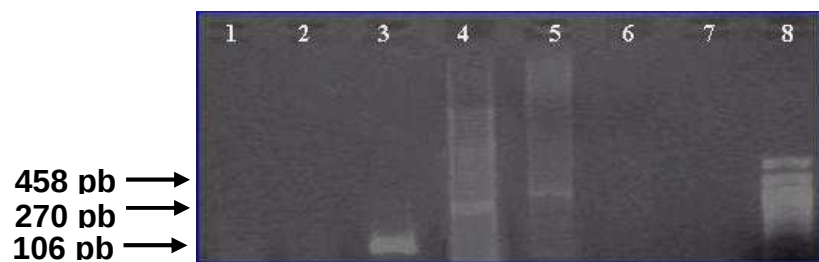


FIGURA 6: Produtos de mPCR obtidos com os *primers* NUC1-NUC2, NUC3-NUC4 e NUC5-NUC6, visualizados em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio, sob luz ultravioleta. 1 – controle negativo 1 (*E. coli* 11229), 2 - controle negativo 2 (*Listeria monocytogenes* ATCC 764), 3 – Produto de mPCR obtido a partir de isolado clínico de *S. intermedius*, 4 – Produto de mPCR obtido a partir de isolado clínico de *S. hyicus*, 5 - Produto de mPCR obtido com *S. aureus* ATCC 29213, 6 - controle negativo 3 (*E. coli* 11229), 7 - controle negativo 4 (água destilada esterilizada), 8 - padrão de peso molecular (100bp DNA Ladder).

4.2.2 LIMITE DE DETECÇÃO DO mPCR PARA *S. aureus*, *S. intermedius* E *S. hyicus* EM CULTURAS PURAS

Como pode ser verificado nas Figuras 7, 8 e 9, foi possível amplificar DNA genômico em concentrações microbianas de até 10^2 UFC.mL⁻¹ para as espécies *S. aureus*, *S. hyicus* e *S. intermedius*. Para esta última houve amplificação em concentrações de até 50 UFC.mL⁻¹, entretanto, o amplicom não foi reproduzível em todas as reações, aceitando-se, assim, o limite de detecção de 10^2 UFC.mL⁻¹, também para essa espécie (Figura 9).

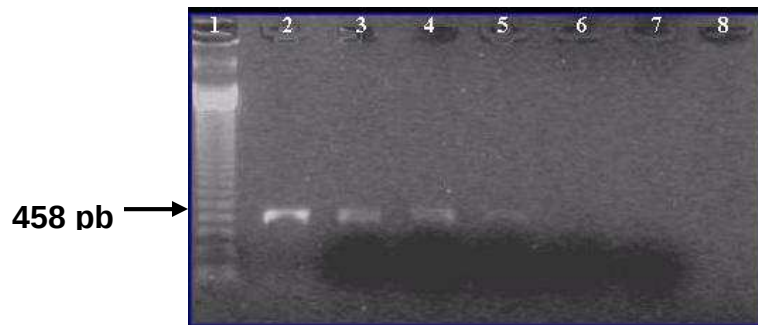


FIGURA 7: Produtos de mPCR obtidos com DNA extraído a partir de concentrações seriadas de *S. aureus* ATCC 29213 amplificado com os *primers* NUC1- NUC2, visualizados em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio, sob luz ultravioleta. 1 - padrão de peso molecular (2log DNA Ladder), 2 - 10^5 UFC.mL⁻¹, 3 - 10^4 UFC.mL⁻¹, 4 - 10^3 UFCmL⁻¹, 5 - 10^2 UFCmL⁻¹, 6 - 50 UFCmL⁻¹, 7 - controle negativo 1 (*E. coli* 11229), 8 - controle negativo 2 (*Listeria monocytogenes* ATCC 764).



FIGURA 8: Produtos de mPCR obtidos com DNA extraído a partir de concentrações seriadas de isolado clínico de *S. hyicus* amplificado com os *primers* NUC3- NUC4, visualizados em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio, sob luz ultravioleta. 1 - padrão de peso molecular (2log DNA Ladder), 2 - 10^5 UFC.mL⁻¹, 3 - 10^4 UFC.mL⁻¹, 4 - 10^3 UFCmL⁻¹, 5 - 10^2 UFCmL⁻¹, 6 - 50 UFCmL⁻¹, 7 - controle negativo 1 (*E. coli* 11229), 8 - controle negativo 2 (*Listeria monocytogenes* ATCC 764).

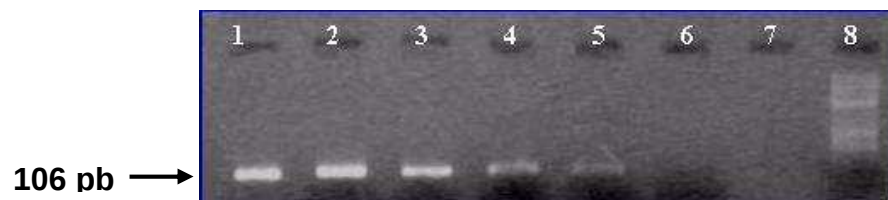


FIGURA 9: Produtos de mPCR obtidos com DNA extraído a partir de concentrações seriadas de isolado clínico de *S. intermedius* amplificado com os *primers* NUC5- NUC6, visualizados em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio, sob luz ultravioleta. 1 - 10^5 UFC.mL⁻¹, 2 - 10^4 UFC.mL⁻¹, 3 - 10^3 UFC.mL⁻¹, 4 - 10^2 UFCmL⁻¹, 5 - 50 UFCmL⁻¹, 6 - controle negativo 1 (*E. coli* 11229), 7 - controle negativo 2

(*Listeria monocytogenes* ATCC 764), 8 - padrão de peso molecular (100bp DNA Ladder).

Tsen *et al.* (1992), Brakstad *et al.* (1992) e Sánchez *et al.* (2003), obtiveram limites de detecção mais efetivos. Os primeiros, trabalhando com PCR para detecção de *S. aureus* produtores das enterotoxinas A, D e E, reportaram um limiar de 10^0 UFC.mL⁻¹ em meios de cultura. Os segundos conseguiram detectar *S. aureus* em concentrações de até 10^1 UFC.mL⁻¹, através da amplificação por PCR de seqüências do gene *nuc*, porém este limite de detecção foi alterado para 10^3 UFC.mL⁻¹ quando o mesmo estudo foi realizado com amostras de sangue. Os últimos autores citados detectaram cepas de *Staphylococcus aureus* enterotoxigênicas, crescidas e isoladas em meios de cultura, até em concentrações de 10^1 UFC. mL⁻¹. A diferença de limiar de detecção entre este estudo e o dos autores citados pode ser associada a pureza do DNA e a existência de inibidores nas amostras (Tamarapu *et al.*, 2001).

4.3 AMOSTRAS DE LEITE

4.3.1 ESPECIFICIDADE DO mPCR PARA *S. aureus*, *S. intermedius* E *S. hyicus* EM LEITE BOVINO INTEGRAL ARTIFICIALMENTE CONTAMINADO

Antes de iniciar os experimentos de avaliação da especificidade do mPCR em amostras de alimentos, foi realizada uma alteração no programa de amplificação inicialmente proposto, sendo a temperatura de ligação dos

primers alterada para 55°C, a fim de evitar a ocorrência de bandas inespecíficas.

Assim como no caso do DNA extraído a partir das culturas isoladas, naquele extraído das amostras de leite também se verificou que os *primers* NUC1 e NUC2 apresentavam especificidade para *S. aureus*, obtendo-se a amplificação somente do fragmento estimado (458pb) a partir de DNA extraído de leite artificialmente contaminado com esta espécie, mesmo na presença dos outros *primers* utilizados no mPCR (Figura 10).

Os *primers* NUC3 e NUC4 foram específicos para *S. hyicus*, pois houve amplificação apenas quando o DNA extraído de leite contaminado com este microrganismo foi utilizado, obtendo-se somente o fragmento estimado (270pb). Com *S. intermedius*, da mesma forma, o fragmento estimado (106 pb) foi obtido sempre que o DNA extraído a partir de leite contaminado com essa espécie microbiana foi submetido a amplificação (Figura 10).

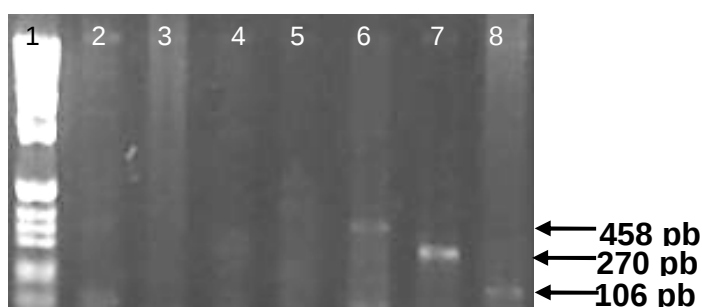


FIGURA 10: Produtos de mPCR obtidos com os *primers* NUC1-NUC2, NUC3-NUC4 e NUC5-NUC6, visualizados em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio, sob luz ultravioleta. 1 – padrão de peso molecular, 2 - controle negativo 1 (*S. epidermidis* ATCC 14990), 3 - controle negativo 2 (*Listeria monocytogenes* ATCC 764), 4 – controle negativo 3 (*E. coli* 11229), 5 - controle negativo 4 (água destilada esterilizada). 6 - Produto de mPCR obtido a partir de leite contaminado com *S. aureus* ATCC 29213, 7 - Produto de mPCR obtido a partir de leite contaminado com isolado clínico de *S. hyicus*, 8 - Produto de mPCR obtidos a partir de leite contaminado com isolado clínico de *S. intermedius*.

Tamarapu *et al.* (2001) desenvolveram um mPCR para detecção de *S. aureus* em leite e derivados através da amplificação dos genes *nuc* e *entC* e, assim como neste trabalho, também verificaram elevada especificidade de seqüências do gene *nuc* para detecção dessa bactéria. Esses resultados

associados à correlação entre esse gene e a produção de enterotoxinas estafilocócicas, conforme descrito por Barski *et al.* (1996), potencializam esse gene como um excelente marcador para pesquisas desse microrganismo em alimentos.

4.3.2 LIMITE DE DETECÇÃO DO mPCR PARA *S. aureus*, *S. intermedius* E *S. hyicus* EM LEITE BOVINO INTEGRAL ARTIFICIALMENTE CONTAMINADO.

Para a avaliação do limite de detecção do conjunto de *primers* proposto em amostras de leite contaminadas artificialmente, assim como nas culturas isoladas, utilizou-se DNA extraído a partir de 5 concentrações microbianas seriadas (aproximadamente 50, 10^2 , 10^3 , 10^4 e 10^5 UFC.mL⁻¹, de cada uma das espécies de ECP), quantificadas a partir de semeadura em ágar Baird-Parker.

Para a espécie *S. aureus* foi possível amplificar concentrações de até 10^2 UFC.mL⁻¹ (correspondente a uma concentração de DNA de 1,63µg.mL⁻¹) demonstrando que o limite de detecção para *S. aureus* foi o mesmo, tanto para culturas isoladas como para culturas em amostras de leite, como pode ser verificado na Figura 11.

Já para *S. hyicus* e *S. intermedius* foram obtidas bandas nítidas e definidas até a concentração 10^3 UFC.mL⁻¹ (correspondente a concentrações de DNA de 7,13µg.mL⁻¹ e 7,63µg.mL⁻¹, respectivamente - Figuras 12 e 13). Na concentração 10^2 UFC.mL⁻¹ foram obtidas bandas fracas, pouco nítidas, que não foram reproduzidas em algumas repetições, por isso é mais adequado aceitar como limite a concentração 10^3 UFC.mL⁻¹.

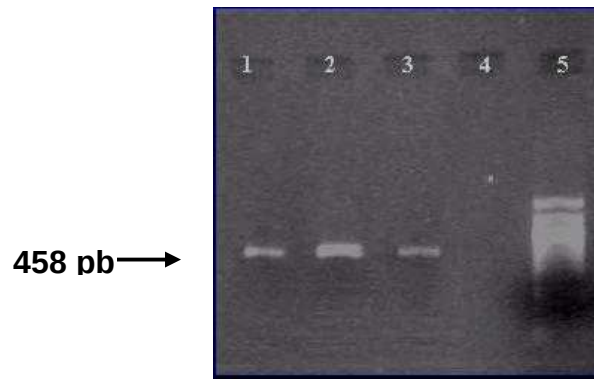


FIGURA 11: Produtos de mPCR obtidos com DNA extraído de amostras de leite inoculado com concentrações seriadas de *S.aureus* ATCC 29213 visualizados em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio, sob luz ultravioleta. 1 - 10^4 UFC.mL⁻¹, 2 - 10^3 UFCmL⁻¹, 3 - 10^2 UFCmL⁻¹, 4 - 50 UFCmL⁻¹, 5 - padrão de peso molecular (100bp DNA Ladder).

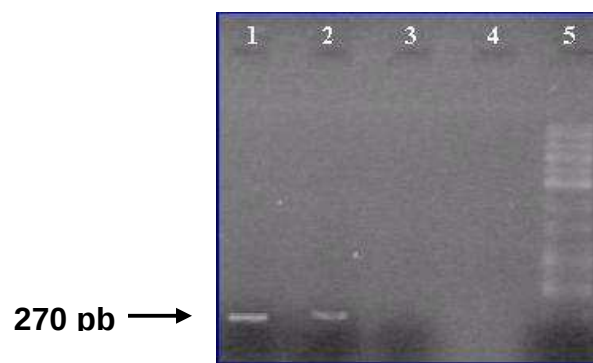


FIGURA 12: Produtos de mPCR obtidos com DNA extraído de amostras de leite inoculado com concentrações seriadas de isolado clínico de *S. hyicus*, visualizados em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio, sob luz ultravioleta. 1 - 10^4 UFC.mL⁻¹, 2 - 10^3 UFCmL⁻¹, 3 - 10^2 UFCmL⁻¹, 4 - 50 UFCmL⁻¹, 5 - padrão de peso molecular (100bp DNA Ladder).

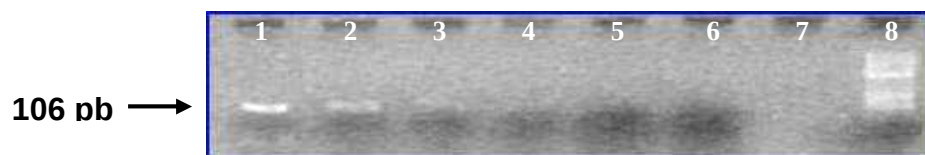


FIGURA 13: Produtos de mPCR obtidos com DNA extraído de amostras de leite inoculado com concentrações seriadas de isolado clínico de *S. intermedius*, visualizados em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio, sob luz ultravioleta. 1 - 10^5 UFC.mL⁻¹, 2 - 10^4 UFC.mL⁻¹, 3 - 10^3 UFCmL⁻¹, 4 - 10^2 UFCmL⁻¹, 5 - 50 UFCmL⁻¹, 6 - 25 UFCmL⁻¹, 7 - 12.5 UFCmL⁻¹, 8 - padrão de peso molecular (100bp DNA Ladder).

- controle negativo 1 (*E. coli* 11229), 7 - controle negativo 2 (*Listeria monocytogenes* ATCC 764), 8 - padrão de peso molecular (100bp DNA Ladder).

Indo ao encontro destes resultados, Tamarapu *et al.* (2001) utilizando um mPCR para detecção do mesmo gene alvo deste estudo em cepas padrão de *S. aureus* em leite e queijo cheddar artificialmente contaminados, também verificaram o limiar de detecção na faixa de 10^2 UFC.mL⁻¹. Limites de detecção menos efetivos foram verificados por Wilson *et al.* (1991) que obtiveram como limite, 10^5 UFC.mL⁻¹.

Outros autores obtiveram um limite de detecção mais efetivo que o encontrado neste estudo. Tsen *et al.* (1992) encontraram 90 UFC.mL⁻¹ como limite para detecção por PCR de *S. aureus* produtores de enterotoxinas em amostras de carne artificialmente contaminadas. Cocolin *et al.* (2000) obtiveram como limiar 10^1 UFC.mL⁻¹ para detecção de *E. coli* por mPCR também em amostras de carne artificialmente contaminadas.

Essas diferenças quanto ao limite de detecção encontrado em experimentos envolvendo mPCR em amostras de alimentos, bem como a ausência de amplificação, na maioria dos casos, em concentrações menores que 10^3 UFC.mL⁻¹, podem estar associados a pureza do DNA e/ou a existência de inibidores em matrizes alimentícias.

Segundo Cribb *et al.* (2002) são necessárias concentrações de DNA iguais ou maiores que 25ng para que haja detecção em um gel corado com brometo de etídio, o que representa 10^{11} cópias de um fragmento com 200 pares de base. Os mesmos autores afirmam que através de cálculos teóricos foi demonstrado que iniciando uma amplificação com 10 moléculas de um DNA molde, a eficiência global dessa reação após 35 ciclos terá que ser de 90% para gerar fragmentos detectáveis. Ressaltam, ainda, que essa eficiência tem sido alcançada em pesquisas, entretanto, não é rotineiramente obtida em diagnósticos clínicos, devido ao problema crítico da influência de inibidores da reação PCR em amostras clínicas e em meios de cultura de microrganismos, que poderiam levar a resultados falso negativos. Já Brakstad *et al.* (1992) descrevem 0,69pg de um DNA molde purificado como o limite mínimo detectável em reações PCR com o gene *nuc*.

Neste trabalho não foi calculada a eficiência global do processo, mas a quantidade de DNA molde obtido a partir de concentrações microbianas iguais ou menores que 10^2UFC.mL^{-1} variaram entre $0,33 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (extraído da concentração de 50UFC.mL^{-1} em leite bovino integral artificialmente contaminado com *S. aureus*) a $1,63 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (extraído da concentração de 10^2UFC.mL^{-1} no leite bovino integral artificialmente contaminado com *S. aureus*) demonstrando que a quantidade de DNA estava acima das relatadas por Brakstad et al. (1992) e Cribb et al. (2002) como crítica, fato que torna possível inferir que a provável causa do não aparecimento de produtos amplificados a partir dessas concentrações de DNA está relacionado com a pureza do DNA e a presença de interferentes, tais como inibidores do processo de amplificação.

A respeito dos inibidores que podem estar presentes no leite bovino integral, os lipídeos são os mais importantes. Conforme relatam Tamarapu et al. (2001) e Rossen et al. (1992) o conteúdo em gordura é, provavelmente, o principal fator interferente no limite de detecção do PCR, sendo necessária a utilização de um extrator de gordura (como éter de petróleo) antes da realização da extração de DNA.

Um fato interessante, destacado por Tamarapu et al. (2001) é que ao utilizar os mesmos *primers* utilizados no mPCR, para as mesmas amostras de leite, só que na forma de um uniplex PCR para identificação de *S. aureus*, o limite de detecção que era de 10^2 passou para 10^1UFC.mL^{-1} . Essa diminuição em uma unidade logarítmica no mPCR indica que o limite de detecção pode estar associado a própria reação, pois, segundo sugerem Chamberlain & Chamberlain (1994), existe uma competição entre os pares de *primers* no mPCR, o que pode contribuir efetivamente para alterar o limite de detecção.

Outro fator que poderia diminuir o limite de detecção em amostras de alimentos é a utilização de um período de enriquecimento não seletivo antes da extração de DNA. Lantz et al. (1998) adicionaram um passo de enriquecimento para obterem um limite de detecção de 10^2UFC.mL^{-1} na detecção de *Yersinia enterocolitica* em amostras de carne suína por mPCR. Jinnemam et al. (1995) usaram mPCR para detectar *E. coli* em leite cru e em

outras amostras de alimentos, adicionando, também, um passo de enriquecimento para aumentar a limite de detecção. Entretanto, um dos objetivos deste trabalho era verificar a aplicação do mPCR diretamente em leite, sem a necessidade de pré-tratamentos, por isso não foram realizadas etapas de pré-enriquecimento ou enriquecimento, além do que, tais procedimentos dificultariam o controle do número de microrganismos e, por sua vez, a análise do limite de detecção.

4.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Comparando-se as técnicas fenotípicas tradicionalmente utilizadas e a técnica molecular proposta neste estudo, pode-se inferir que depois de estabelecida a estrutura laboratorial para ambas as técnicas, o tempo de análise requerido é menor para aquela baseada em PCR, quando comparada ao método tradicional.

Com o mPCR utilizado neste estudo, pode-se obter resultados em 24 horas, no entanto, recentes estudos têm proposto a execução da extração de DNA através de ação química, associada a lise por aquecimento, possibilitando que análises baseadas em PCR sejam realizadas em um período de 6 a 8 horas (Tamarapu *et al.*, 2001). Já as técnicas fenotípicas comumente utilizadas demandam um tempo maior de análise e, na maioria dos casos, são necessários vários testes para uma identificação em nível de espécie. Por exemplo, só para a caracterização como ECP, sem a diferenciação em nível de espécie realiza-se um crescimento em ágar diferencial seletivo (Baird-Parker) seguido dos testes da coagulase livre e da produção de termonuclease, demandando um tempo mínimo de 72 horas para se obter o resultado.

Deve-se levar em consideração, ainda, que na maioria dos testes fenotípicos pode ocorrer variabilidade de resultados, com a ocorrência de

resultados falso-negativos, reflexo da ação de fatores ambientais sobre a expressão gênica, conforme descrevem Farber et al. (2001).

Dois aspectos que são sugeridos para serem avaliados na continuidade deste estudo são a melhoria da etapa de extração do DNA, o que poderia possibilitar a obtenção de limites de detecção inferiores aos obtidos, bem como a inclusão de um controle interno da amplificação (IAC - *Internal Amplification Control*), para detecção de inibição da reação PCR (Rampersad et al., 2005).

De qualquer modo, o conjunto de *primers* proposto mostrou-se específico e apresentou limite de detecção aceitável para identificar *S. aureus*, *S. intermedius* e *S. hyicus* na matriz alimentícia utilizada, no caso o leite bovino integral, levando-se em consideração que o limiar de detecção verificado foi de 10^3 UFC.mL⁻¹. Salienta-se que o número mínimo de ECP capaz de produzir enterotoxinas em alimentos em quantidade suficiente para causar intoxicação alimentar é de, aproximadamente, 10^6 UFC (Jay, 1996; Jablonski & Bonach, 1997; Tamarapu et al., 2001). Além disso, para a maioria dos alimentos, as legislações em geral exigem como limite permissível para ECP o valor de 10^3 UFC.mL⁻¹ (RDC nº12, Brasil 2001), fato que reitera a adequação do limite de detecção verificado.

A partir dos resultados obtidos pode-se sugerir que o mPCR descrito, com o conjunto de *primers* proposto, tem potencial para ser utilizado na identificação e diferenciação precisa entre ECP em amostras de leite.

5 CONCLUSÕES

- a) A amplificação por mPCR de seqüências do gene *nuc*, utilizando os *primers* NUC1, NUC2, NUC3, NUC4, NUC5 e NUC6 possibilita a identificação e diferenciação entre as espécies *S. aureus*, *S. hyicus* e *S. intermedius*, em culturas puras e em amostras de leite bovino integral artificialmente contaminadas com essas bactérias.
- b) O limiar de detecção para as três espécies de estafilococos coagulase positiva foi de 10^3UFC.mL^{-1} tanto a partir das culturas puras, quanto em amostras de leite artificialmente contaminadas.
- c) O mPCR proposto pode ser utilizado diretamente em leite bovino integral sem a necessidade pré-tratamentos ou de isolamento bacteriano.
- d) A técnica de mPCR com seqüências do gene *nuc*, utilizando os *primers* NUC1, NUC2, NUC3, NUC4, NUC5 e NUC6 diminui em 48 horas o tempo de análise requerido para detecção de estafilococos coagulase positiva em leite bovino integral, quando comparado a técnicas fenotípicas tradicionalmente utilizadas.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AARESTRUP, F. M., WEGENER, H. C., ROSDAHL, V. T. Evaluation of phenotypic and genotypic methods for epidemiological typing of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis in Denmark. **Veterinary Microbiol.**, v.45, p.139-150, 1995.
- ADESIYUN, A. A., TATINI, S. R., HOOVER, D.G. Production of enterotoxin(s) by *Staphylococcus hyicus*. **Veterinary Microbiol.**, v.9, p.487-495, 1984.
- ANTONIOLLO, P. C. **Listeria spp. em ovinos e carcaças ovinas em nível de abatedouro.** 2001. 83f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) - Faculdade de Agronomia "Eliseu Maciel", Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.
- ARBUTHNOTT, J. P., COLEMAN, D. C., AZAVEDO, J. S. Staphylococcal toxins in human disease. **J. Appl. Bacteriol.**, v.19, p.101-107, 1990.
- 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.
- BAIRD-PARKER, A. C. The basis for the classification of staphylococci and micrococci. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v.236, p.7-14. 1974.

- BALABAN, N., RASOOLY, A. Staphylococcal enterotoxins. **Int. J. Food Microbiol.**, v.61, p.1-10, 2000.
- BANDEIRA, F. S. **Morfologia e comportamento bioquímico de cepas de *Staphylococcus aureus*, *S. intermedius* e *S. hyicus* isoladas em vacas leiteiras.** Pelotas, 2001. 46f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) - Faculdade de Agronomia "Eliseu Maciel", UFPel, 2001.
- BANNERMAN, T. L., HANCOCK, G. A., TENOVER, F. C., MILLER, J. M. Pulsed-field gel electrophoresis as a replacement for bacteriophage typing of *Staphylococcus aureus*. **J. Clin. Microbiol.**, v.33, p.551-555, 1995.
- BARON, F., COCHET, M. O., PELLERIN, J.L., ZAKOUR, N. B., LEBON, A., NAVARRO, A., PROUDY, I., LE LOIR, Y., GAUTIER, M. Development of a PCR test to differentiate between *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus intermedius*. **Journal of Food Protection**, v.67, p.2302–2305, 2004.
- BARSKI, P., PIECHOWICZ, L., GALINSKI, J., KUR, J. Rapid assay for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using multiplex PCR. **Molecular and Cellular Probes**, v.10 p.471–475, 1996.
- BASCOMB, S., MANAFI, M. Use of enzyme tests in characterization and identification of aerobic and facultative anaerobic gram-positive cocci. **Clinical Microbiol. Reviews**, v.11, n.2, p.318-340, 1998.
- BAUMGARTNER, A., NICOLET, J., EGGIMANN, M. plasmid profiles of *Staphylococcus* causing bovine mastitis. **J. Appl. Bacteriol.**, v.56, p.159-163, 1984.
- BECKER, K., VON EIFF, C., KELLER, B., BRÜCK, M., ETIENNE, J., PETERS, G. Thermonuclease gene as a target for specific identification of *Staphylococcus intermedius* isolates: Use of a PCR-DNA enzyme immunoassay. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.51, p.237-244, 2005.

- BERGDOLL, M. S. Staphylococcal food poisoning. In: DEAN, C. **Foodborne diseases**. 4 ed., San Diego: Academic Press, 1990. p.85-106.
- BERGDOLL, M. S., BORJA, C. R., AVENA, R. M. Identification of a new enterotoxin as enterotoxin C. **J. Bacteriol.**, v.90, p.1481-1485, 1965.
- BERGDOLL, M. S., BORJA, C. R., ROBBINS, R. N., WEISS, K. F. Identification of enterotoxin E. **Infect. Immun.**, v.4, p.593-595, 1971.
- BERGDOLL, M. S., SURGALLA, M. J., DACK, G. M. Staphylococcal enterotoxin: Identification of a specific precipitating antibody with enterotoxin neutralizing property. **J. Immunol.**, v.83, p.334-338, 1959.
- BOER, E., BEUMER, R. R. Methodology for detection and typing of foodborne microorganisms. **Int. J. Food Microbiol.**, v.50, p.119-130, 1999.
- BORJA, C. R., BERGDOLL, M. S. Purification and partial characterization of enterotoxin C produced by *Staphylococcus aureus* strain 137. **Biochemistry**, v.6, p.1467-1473, 1967.
- BRAKSTAD, O. G., AASBAKK, K., MAELAND, J. A. Detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction amplification of the *nuc* gene. **J. Clin. Microbiol.**, v.30, p.1654–1660, 1992.
- BRASIL. Portaria nº 451, de 19 de setembro de 1997. Regulamento técnico. Princípios gerais para o abastecimento de critérios e padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasil, nº182, p. 21005-21011, 22 set. 1997, seção I.
- BRASIL. Resolução-RDC nº 12, de 02 de Janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da Republica Federativa do Brasil**, Brasil, nº 7-E, p. 46-53, 10 Jan. 2001, seção I.
- BRITO, M. A. V. P., CAMPOS, G. M. M., BRITO, J. R. F. Esquema simplificado para identificação de Estafilococos coagulase-positivos isolados de mastite bovina. **Ciência Rural**, v.32, n.1, p.79-82, 2002.

- BUSH, U, NITSCHKO, H. Methods for differentiation of microorganisms. **J. Chromatography**, v.722, p.263-278, 1999.
- CAPURRO, A., CONCHA, C., NILSSON, L., ÖSTENSSON, K. Identification of coagulase-positive Staphylococci isolated from bovine milk. **Acta Vet. Scand.**, v.40, p.315-321, 1999.
- CASMAN, E. P. Further serological studies of staphylococcal enterotoxin. **J. Bacteriol.**, 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. **J. Bacteriol.**, v.94, p.1875-1882, 1967.
- CAUDIL, F. M., MEYER, M. A. An epidemic of food poisoning due to pasteurized milk. **J. Milk Technol.**, v.6, p.73-76, 1943.
- CHAMBERLAIN, J. S., CHAMBERLAIN, J. R. Optimization of multiplex PCRs, In: MULLIS, K.B.; FERRÉ, F.; GIBBS R.A. (eds.). **The Polymerase Chain Reaction**. Cambridge: Birkhäuser Boston, 1994. p.38-45.
- COCOLIN, L., MANZANO, M., CANTONI, C., COMI, G. A multiplex PCR method to detect enterohemorrhagic (EHEC) and enteropathogenic (EPEC) *Escherichia coli* in artificially contaminated foods. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 203, p. 159-164, 2000.
- CORBELLA, X., DOMINGUEZ, M. A., PUJOL, M., AYATS, J., SENDRA, M., PALLARES, R., ARIZA, J., GUDIOL, F. *Staphylococcus aureus* nasal carriage as a marker for subsequent staphylococcal infections in intensive care unit patients. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v.16, p.351-357, 1997.
- CRABTREE, J., LITTERER, W. Outbreak of milk poisoning due to a toxin producing *Staphylococcus* found in udders of two cows. **Amer. J. Publ. Health**, v.24, p.1116-1120, 1934.

- CRIBB, P., SCAPINI, J. P., SERRA, E. One-tube Nested Polymerase Chain Reaction for Detection of *Chlamydia trachomatis*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.97, n.6, p.897-900, 2002.
- CUNY, C., CLAUS, H., WHITE, W. Discrimination of *S. aureus* strains by PCR for rRNA gene spacer size polymorphism and comparison to *Sma*I macrorestriction patterns. **Zbl. Bakt.**, v.283, p.466-476, 1996.
- DEVRIESE, L. A., HAJEK, V., OEDING, P., MEYER, S. A., SCHLEIFER, K. H. *Staphylococcus hyicus*. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v.28, p.482-490, 1978.
- DOWNES, F. P., ITO, H. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4. ed. Washington: American Public Health Association (APHA), 2001. 676p.
- DRANCOURT, M., RAOULT, D. *RpoB* gene sequence-based identification of *Staphylococcus* Species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p.1333–1338, 2002.
- EUZÉBY, J. P. List of bacterial names with standing in nomenclature: a folder available on the Internet. Disponível em: < <http://www.bacterio.net>. Acesso em 23 de janeiro de 2006.
- FARBER, J. M., GENDEL, S. M., TYLER, K. D., BOERLIN, P., LANDRY, W. L., FRITSCHER, S. J., BARRETT, T. J. Molecular typing and differentiation. In: DOWNES, F. P., ITO, H. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4. ed. Washington: American Public Health Association (APHA), 2001. Chap. 11, p.127-158.
- FITZGERALD, J. R., MEANEY, W. J., HARTIGAN, P. J., SMITH, C. J., KAPUR, V. Fine-structure molecular epidemiological analysis of *Staphylococcus aureus* recovered from cows. **Epidemiol. Infect.**, v.119, p.261-269, 1997.
- FORSMAN, P., TILSALA-TIMISJÄRVI, A., ALATOSSAVA, T. Identification of Staphylococcal and Streptococcal causes of bovine mastitis using 16S-23S rRNA spacer regions. **Microbiology**, v.143, p.3491-3500, 1997.

- FRANCO, B. D. G. M., LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. 2 ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2002. 184p.
- FRAZIER, W. C.; WESTHOFF, D. C. **Microbiologia de los alimentos**. Zaragoza: Ed. Acribia S. A. 1993.
- FRÉNEY, H. M. E., BUNSCHOTEN, A. E., SCHOULS, L. M., VAN LEEUWEN, W. J., VANDENBROUCKE-GRALS, C. M. J. E., VERHOEF, J., MOOI, F. R. Molecular typing of methicilin-resistant *Staphylococcus aureus* on the basis of protein A gene polymorphisms. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v.15, p.60-64, 1996.
- FRENEY, J., BRUN, Y., BES, M. *Staphylococcus lugdunensis* sp. nov. and *Staphylococcus schleiferi* sp. nov., two species from human clinical specimens. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v.38, p.168-172, 1988.
- GALBRAITH, N. S., FORBES, P., CLIFFORD, C. Communicable disease associated with milk and dairy products in England and Wales 1951- 1980. **Brith. Med. J.**, v.284, p.1761-1765, 1982.
- GANDRA, E. A. **Identificação de *Staphylococcus aureus*, *S. hyicus* e *S. intermedius* através de testes bioquímicos e da amplificação por PCR de sequências dos genes *coa* e *nuc***. Pelotas, 2003. 101f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) - Faculdade de Agronomia "Eliseu Maciel", UFPel, 2003.
- GANDRA, E. A., SILVA, J. A., MACEDO, M. R. P., ARAÚJO, M. R., MATA, M. M., SILVA, W. P. Biochemical differentiation among *S. aureus*, *S. Intermedius* AND *S. hyicus* isolated from bovines with subclinical mastitis. **Archives of Veterinary Science** v.10, n.1, p. 75 - 81, 2005.
- GOH, S. H., BYRNE, S. K., ZHANG, J. L., CHOW, A. W. Molecular typing of *Staphylococcus* on the basis of coagulase gene polymorphism. **J. Clin. Microbiol.**, v.30, n.7, p.1642–1645, 1992.
- GÜRTLER, V., BARRIE, H. D. Typing of *Staphylococcus aureus* strains by PCR amplification of variable length 16S-23S rDNA spacer regions:

characterization of spacer sequences. **Microbiology**, v.141, p.1255-1265, 1995.

HAJDENWURCEL, J. R. Microrganismos patogênicos. In: **Atlas de microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Fonte Comunicações e Editora Ltda, 1998. Cap.3, p.35-57.

HÁJEK, V. *Staphylococcus intermedius*, a new species isolated from animals. **Int. J. Syst. Bacteriol**, v.26, p.401-408, 1976.

HEALTH PROTECTION AGENCY (HPA). Thermonuclease test. **National Standard Method BSOP TP 34 Issue, 2004**. Disponível em: <http://www.hpa-standardmethods.org.uk/pdf_sops.asp>. Acesso em 03 de janeiro de 2006.

HILL, B. M. The termo-stable nuclease test as a method for identifying *Staphylococcus aureus*. **The Australian J. Dairy Technol.**, v.9, p.95-96, 1983.

HIROOKA, E. Y., MULLER, E. E., FREITAS, J. C., VICENTE, E., YASHIMOTO, Y., BERGDOLL, M. S. Enterotoxigenicity of *Staphylococcus intermedius* of canine origin. **J. Food Microbiol.**, 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 04 de outubro de 2005.

HOOKEY, J. V., RICHARDSON, J. F., COOKSON, B. D. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* based on PCR restriction fragment length polymorphism and DNA sequence analysis of the coagulase gene. **J. Clin. Microbiol.**, v.36, p.1083-1089, 1998.

HOOVER, D. G., TATINI, S. R., MALTAIS, J. B. Characterization of staphylococci. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.46, p.649-660, 1983.

- HUGHES, E., CONDON, J., MORLEY, A. A. Quantification of targets for PCR by use of limiting dilution. In: LARRICK, J. W. **The PCR technique: quantitative PCR**. Natick Mass: Eaton Publishing, 1997. p. 81–93.
- HUI, Y. H., GORHAM, J. R., MURREL, K. D., CLIVER, D. O. **Foodborne diseases handbook: diseases caused by bacteria**. New York: Marcel Decker Inc., 1994. 613p.
- INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS (ICMSF). Leche y productos lácteos. In: **Ecología Microbiana de los alimentos: productos alimenticios**. Zaragoza: Editorial Acribia S.A., 1985. Cap. 18, p.472-525.
- JABLONSKI, L. M., BOHACH, G. A. *Staphylococcus aureus*. In: DOYLE, M. P., BEUCHAT, L. R., MONTVILLE, T. J. (ed.). **Food microbiology fundamentals and frontiers**. Washington: American Society of Microbiology Press, 1997. p. 353-375.
- JAY, J. M. **Modern Food Microbiology**. Fifth Edition. London: Chapman & Hall, 1996, 661 p.
- JAYARAO, B. M., GILLESPIE, B. E., OLIVER, S. P. Application of randomly amplified polymorphic DNA fingerprint for species identification of bacteria isolated from bovine milk. **J. Food Prot.**, v.59, p.615-620, 1996.
- JINNEMAM, K. C.; TROAST, P. A.; HILL, W. E.; WEAGANT, S. D.; BRYANT, J. L.; KAYSNER, C. A.; WEKELL, M. M. Comparison of template preparation methods from foods for amplification of *Escherichia coli* O157 shiga-like toxins type II DNA by multiplex polymerase chain reaction. **Journal of Food Protection**, v.58, p.722-726, 1995.
- KHAMBATY, F. M., BENNETT, R. W., SHAH, D. B. Pulsed-field gel electrophoresis to the epidemiological characterisation of *Staphylococcus intermedius* implicated in a food-related outbreak. **Epidemiol. Infect.**, v.113, p.75–81, 1994.

- KIM, C. H., KHAM, M., MORIN, D. E., HURLEY, W. L., TRIPATHY, D. N., KEHRLI JR, M., OLUOCHT, A. O., KAKOMAT, I. Optimization of the PCR for detection of *Staphylococcus aureus* nuc gene in bovine milk. **J. Dairy Science**, v.84, p.74-83, 2001.
- KLOOS, W. E., BANNERMAN, T. L. *Staphylococcus* and *Micrococcus*. In: MURRAY, P. R., BARON, E. J., PFALLER, M. A., TENOVER, F. C., YOLKEN, R. H. **Manual of Clinical Microbiology**. 7 Ed. Washington: American Society for Microbiology, 1999. Chap.16, p.264-282.
- KONEMAM, E. W., ALLEN, S. D., JANDA, W. M., SCHRECKENBERGER, P. C., WINN JR., W. C. **Diagnóstico Microbiológico**. São Paulo: Medsi Editora Médica e Científica Ltda., 2001. 1466p.
- LANTZ, P. G., KNUTSSON, R., BLIXT, Y., AL-SOUD, W. A., BORCH, E., RADSTROM, P. Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in enrichment media and pork by a multiplex PCR: a study of sample preparation and PCR inhibitory components. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 45, p.93-105. 1998.
- 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. **J. Bacteriol.**, v.176, p.5534-5536, 1994.
- LEVY, C. E. Aspectos Microbiológicos. In: RODRIGUES, E. A. C., MENDONÇA, J. S., AMARANTE, J. M. B., FILHO, M. B. A., GRINBAUM, R. S., RICHTMANN, R. **Infecções hospitalares: prevenção e controle**. São Paulo: Sarvier, 1997. p.591-598.
- LIEBL, W., ROSENSTEIN, R., GOTZ, F., SCHLEIFER, K. H. Use of a staphylococcal nuclease gene as DNA probe for *Staphylococcus aureus*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v.44, p.179-184, 1987.
- LOPES, H. R. **Avaliação da produção de enterotoxinas estafilocócicas A, D e E**. Rio de Janeiro: Instituto de Microbiologia da Universidade Federal do Rio do Janeiro, 1990. 68p.

- LOUREIRO, M. M., MORAES, B. A., QUADRA, M. R. R., PINHEIRO, G. S., SUFFYS, P. N., ASENSI, M. D. Molecular epidemiology of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolated from newborns in a hospital in Rio de Janeiro, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.95, n.6, p.777-782, 2000.
- MAES, N., MAGDALENA, J., ROTTIERS, S., DE GHELDRE, Y., STRUELENS, M. J. Evaluation of a triplex PCR assay to discriminate *Staphylococcus aureus* from coagulase-negative Staphylococci and determine methicillin resistance from blood cultures. **J. Clin. Microbiol.**, v.40, n.4, p.1514–1517, 2002.
- MALORNY, B., TASSIOS, P. T., RADSTRÖM, P., COOK, N., WAGNER, M., HOORFAR, J. Standardization of diagnostic PCR for the detection of foodborne pathogens. **Int. J. Food Microbiol.**, Article in Press, 2002.
- MARTIN, S. E., MYERS, E. R. *Staphylococcus aureus*. In: HUI, Y. H., GORHAM, R., MURREL, K. D., CLIVER, D. O. **Foodborne disease handbook. Diseases caused by bacteria**. New York: Marcel Decker, 1994. p.345-394.
- MATOS, J. E. S., HARMON, R. J., LANGLOIS, B. E. Lecithinase reaction of *Staphylococcus aureus* strains of different origin on baird parker medium. **Letters in Applied Microbiol.**, v.21, p.334-335, 1995.
- MATTHEWS, K. R., KUMAR, S. J., O'CONNER, S. A., HARMON, R. J., PANKEY, J. W., FOX, L. K., OLIVER, S. P. Genomic fingerprints of *Staphylococcus aureus* of bovine origin by polymerase chain reaction-based DNA fingerprinting. **Epidemiol. Infect.**, v.112, p.177-186, 1994
- MATTHEWS, K. R., OLIVER, S. P. Differentiation of *Staphylococcus* species by polymerase chain reaction-based DNA Fingerprinting. **J. Food Prot.**, v.57, n.6, p. 486-489, 1994.
- MATTHEWS, K. R., ROBERSON, J., GILLESPIE, B. E., LUTHER, D. A., OLIVER, S. P. Identification and differentiation of coagulase-negative *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction. **J. Food Prot.**, v.60, n.6, p. 686-688, 1997.

- MEEHAN, P.J., ATKESON, T., KEPNER, D.E., MELTON, M. A foodborne outbreak of gastroenteritis involving two different pathogens. **American Journal of Epidemiology**, v.136, n.5, p. 611-616, 1992.
- MEIRI-BENDEK, I., LIPKIN, E., FRIEDMANN, A., LEITNER, G., SARAN, A., FRIEDMAN, S., KASHI, Y. A PCR-based method for the detection of *Streptococcus agalactiae* in milk. **J. Dairy Sci.**, v.85, p.1717-1723, 2002.
- MINOR, T. E., MARTH, E. H. *S. aureus* and Staphylococcal food intoxication. A review. II – Enterotoxins and epidemiology. **J. Milk Food Technol.**, v.35, p.21-29, 1972.
- MINOR, T. E., MARTH, E. H. **Staphylococci and their significance in foods.** Elsevier Scientific Publishing. 1976.
- MIWA, N., KAWAMURA, A., MASUDA, T., AKIYAMA, M. An outbreak of food poisoning due to egg yolk reaction-negative *Staphylococcus aureus*. **Int. J. Food Microbiol.**, v.64, p. 361-366, 2001.
- MORVAN, A., AUBERT, S., GODARD, C., ELSOLH, N. Contribution of typing method based on IS256 probing of *SmaI* digested cellular DNA to discrimination of European phage type 77 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. **J. Clin. Microbiol.**, v.35, p.1415–1423, 1997.
- MOTTA, O. V., FOLLY, M. M., SAKYIAMA, C. C. H. Detection of different *Staphylococcus aureus* strains in bovine milk from subclinical mastitis using PCR and routine techniques. **Brazilian J. Microbiol.**, v.31, p.32-37, 2001a.
- MOTTA, O. V., RIBEIRO, P. D., SILVA, W. D., ACOSTA, E. M. RNAlII inhibiting peptide (RIP) inhibits agr-regulated toxin production. **Peptides**, v.22, n.10, p.1621-1627, 2001b.
- NAWAS, T., HAWWARI, A., HENDRIX, E., HEBDEN, J., EDELMAN, R., MARTIN, M., CAMPBELL, W., NASO, R., SCHWALBE, R., FATTOM, A. I. Phenotypic and genotypic characterization of nosocomial *Staphylococcus*

aureus isolates from trauma patients. **J. Clin. Microbiol.**, v.36, n.2, p.414-420, 1998.

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

OLIVEIRA, J. S., SANTOS, D. A., CARMO, L. S., CHIANCA, T. C. M. Estudo da flora microbiana de pessoal de enfermagem de uma unidade de centro cirúrgico de um hospital universitário de Belo Horizonte. **Rev. Min. Enf.**, v.3, p.13-19, 1999.

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

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

PASSOS, M. H. C. R., KUAYE, A. Y. Relato de surtos de intoxicação alimentar provocada por consumo de bolo contaminado por *Staphylococcus aureus*, importância da higiene dos manipuladores e condições de conservação do alimento na prevenção da doença. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.56, n.1, p. 71-76, 1996.

POTTUMARTHY, S., SCHAPIRO, J. M., PRENTICE, J. L., HOUZE, Y. B. SWANZY. S. R., FANG, F. C., COOKSON, B. T. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, p.5881–5884, 2004.

RAMPERSAD, J. N., WATKINS, J. D., SAMLAL, M. S., DEONANAN, R., RAMSUBEIK, S., AMMONS, D. R. A nested-PCR with an Internal Amplification Control for the detection and differentiation of *Bartonella henselae* and *B. clarridgeiae*: An examination of cats in Trinidad. **BMC Infectious Diseases**, v.5, n.63, p.1471-2334, 2005.

- RAUS, J., LOVE, D. N. Characterization of coagulase-positive *Staphylococcus intermedius* and *Staphylococcus aureus* isolated from veterinary clinical specimens. **J. Clin. Microbiol.**, v.18, p.789-792, 1983.
- 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. **Infect. Immun.**, v.45, p.625-630, 1984.
- ROBERSON, J. R., FOX, L. K., HANCOCK, D. D., BESSER, T. E. Evaluation of methods for differentiation of coagulase-positive Staphylococci. **J. Clin. Microbiol.**, v.30, p.3217-3219, 1992.
- ROSSEN, L., NORSKOV, P., HOLMSTROM, K., RASMUSSEM, O. F. Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 17, p. 37-45, 1992.
- SABIONI, J. G., NASCIMENTO, D., PEREIRA, J. L. Intoxicação estafilocócica causada por queijo tipo minas em Ouro Preto (MG), 1992. **Higiene Alimentar**, v.8, n.33, p. 22-23, 1994.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F., MANIATIS. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- SÁNCHEZ, G. N., RODRÍGUEZ, R. M., OLVERA, P. R., GARZA, L. M. Development of Two Multiplex Polymerase Chain Reactions for the Detection of Enterotoxigenic Strains of *Staphylococcus aureus* Isolated from Foods. **Journal of Food Protection** v.66, p.1055–1062, 2003.
- SCHLICHTING, C., BRANGER, C., FOURNIER, J. M., WITTE, W., BOUTONNIER, A., WOLZ, C., GOULLET, P., DORING, G. Typing of *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis, zymotyping, capsular typing, and phage typing: resolution of clonal relationships. **J. Clin. Microbiol.**, v.31, n.27, p.227-232, 1993.

- SCHWARZKOPF, A., KARCH, H. Genetic variation in *Staphylococcus aureus* coagulase genes: Potential and limits for use as epidemiological marker. **J. Clin. Microbiol.**, v.32, p.2407-2412, 1994.
- SHAUGNESSY, H. J., GRUBB, T. C. The incrimination of milk and milk products in *Staphylococcus* poisoning. **Ibid.**, v.28, p.229-234, 1937.
- SILVA, N., JUNQUEIRA, V. C. A., SILVEIRA, N. F. A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**, São Paulo: Livraria Varela, 2001. 317p.
- SILVA, W. P. **Caracterização fenotípica e genotípica de cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas de leite de vacas com mastite subclínica e de outras fontes em propriedades produtoras de leite**. 1998. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- SILVA, W. P., SILVA, J. A., MACEDO, M. R. P., ARAÚJO, M. R., MATA, M. M., GANDRA, E. A. Identification of *Staphylococcus aureus*, *S. intermedius*, and *S. hyicus* by PCR amplification of *coa* and *nuc* genes. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.34, p.125-127, 2003.
- SIQUEIRA, R. S. **Manual de microbiologia dos alimentos**. Brasília: Embrapa, 1995.
- SNEATH, P. H. A., MAIR, N. S., SHARPE, M. E. Gram positive cocci. In: **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9 Ed. Baltimore: The Williams & Wilkins Co, 1986. v.2, p.999-1103.
- STRUELENS, M. J., DEPLANO, A., GODARD, C., MAES, N., SERRUYS, E. Epidemiologic typing and delineation of genetic relatedness of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by macrorestriction analysis of genomic DNA by using pulsed-field gel electrophoresis. **J. Clin. Microbiol.**, v.30, p.2599-2605, 1992.
- SU, Y. C., WONG, A. C. L. Current perspectives on detection of Staphylococcal enterotoxins. **J. Food Prot.**, v.60, n.2, p.195-202, 1997.

- SU, Y. C., WONG, A. C. L. Identification and purification of a new staphylococcal enterotoxin, H. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.61, p.1438-1443, 1995.
- TAKEUCHI, S., MURASE, K., KAJDOH, T., MAEDA, T. A Metalloprotease is common to swine, avian and bovine isolates of *Staphylococcus hyicus*. **Veterinary Microbiol.**, v.71, p.169-174, 2000.
- 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. **J. Food Prot.**, v.64, n.5, p.664-668, 2001.
- TANG, Y., PERSING, D. Molecular detection and identification of microorganisms. In: MURRAY, P. R., BARON, E. J., PFALLER, M. A., TENOVER, F. C., YOLKEN, R. H. **Manual of Clinical Microbiology**. 7 Ed. Washington: American Society for Microbiology, 1999. Cap.13, p.215-244.
- TOLLERSRUD, T., KENNY, K., REITZ JR., A. J., LEE, J. C. Genetic and serologic evaluation of capsule production by bovine mammary isolates of *Staphylococcus aureus* and other staphylococcus spp. from Europe and the United States. **J. Clin. Microbiol.**, v.38, n.8, p.2998-3003, 2000.
- TRANter, H. S. **Foodborne illness. Foodborne staphylococcal illness**. London: Lancet , 1990. v.27.
- TSEN, H. Y., CHEN, T. R. Use of polymerase chain reaction for detection of type A, D, and E enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in foods. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 53, p. 88-91, 1992.
- VALLE, J., GOMEZ-LUCIA, E., PIRIZ, S., GOYACHE, J., ORDEN, J. A., VADILLO, S. Enterotoxin production by staphylococci isolated from healthy goats. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.56, p.1323-1326, 1990.
- VAN BELKUM, A., RIEWARTS, E., SIJMONS, M., VAN LEEUWEN, W., VAN DEN BERGH, M., KLUYTMANS, J., ESPERSEN, F., VERBRUGH, H. Coagulase and protein A polymorphisms do not contribute to persistence of

nasal colonization by *Staphylococcus aureus*. **J. Med. Microbiol.**, v.46, p.222-232, 1997.

VARALDO, P. E., KILPPER-BALZ, R., BIAVASCO, F. *Staphylococcus delphini* sp. nov., a coagulase positive species isolated from dolphins. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v.38, p.436-439, 1988.

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

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

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

WELSH, J., MCCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Res.**, v.18, p.7213-7218, 1990.

WILSON, I. G., COOPER, J. E., GILMOR, A. Detection of enterotoxigenic of *Staphylococcus aureus* in dried skimmed milk: use of polymerase chain reaction for amplification and detection of staphylococcal enterotoxin genes entB and entC1 and the thermonuclease gene nuc. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.57, p.1793-1798, 1991.

WINZER, K., WILLIAMS, P. Quorum sensing and the regulation of virulence gene expression in pathogenic bacteria. **Int J Med Microbiol.**, v.291, n.2, p.131-43, 2001.

YUGUEROS, J., TEMPRANO, A., SÁNCHEZ, M., LUENGO, J. M., NAHARRO, G. Identification of *Staphylococcus* spp. by PCR-restriction fragment length polymorphism of *gap* gene. **J. Clin. Microbiol.**, v.39, n.10, p.3693-3695, 2001.