



IDENTIFICAÇÃO DE *Staphylococcus aureus* ISOLADOS DE DIFERENTES ALIMENTOS

BASTOS, Caroline Peixoto¹; BASSANI, Milena Tomasi.²; SILVA, Wladimir Padilha³

^{1, 2, 3} Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial, FAEM, UFPel
Campus Universitário – Caixa Postal 354 – CEP 96010-900. carolpebastos@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

Staphylococcus aureus é considerado um patógeno oportunista, que causa várias síndromes infecciosas em humanos, bem como é capaz de causar intoxicação alimentar através da produção de enterotoxinas (EE) (Baron et al, 2004; Cremonesi et al. 2005). Devido ao caráter autolimitante da doença, com sintomatologia branda e de curta duração, os casos e surtos desse tipo de intoxicação, raramente levam as pessoas envolvidas a procurarem auxílio médico, fazendo com que o índice de hospitalização e, conseqüente notificação, seja relativamente baixo. A identificação laboratorial de *S. aureus* é um fator importante na elucidação dos casos e surtos de enfermidades transmitidas por alimentos.

Os métodos microbiológicos tradicionais de identificação de patógenos em alimentos são limitantes, principalmente pela necessidade de um elevado tempo para a obtenção de um diagnóstico conclusivo. Além disso, segundo Cremonesi et al. (2005), os testes bioquímicos padrão rotineiramente utilizados para identificação em nível de espécie não apresentam sensibilidade inteiramente satisfatória. Já os métodos moleculares vêm sendo estudados e utilizados por diversos pesquisadores como ferramentas para tornar as análises de identificação e diferenciação de microrganismos em alimentos mais rápidas e eficazes. Nesse aspecto, o desenvolvimento de métodos baseados em PCR para diagnóstico microbiano estabeleceu uma alternativa viável aos métodos tradicionais de cultura (Malorny et al. 2002).

Uma variação dessa técnica que vem sendo empregada de maneira crescente nos últimos anos, visando a identificação bacteriana é o multiplex PCR (mPCR). Nessa técnica é utilizado mais de um par de *primer* na mesma reação, possibilitando a amplificação simultânea de mais de uma seqüência de DNA, permitindo que mais de uma espécie bacteriana possa ser identificada em uma mesma reação PCR. Desta forma, promovendo uma análise mais ampla, mais rápida e mais barata da presença de bactérias patogênicas em alimentos (Gandra, 2006). Entretanto, entre os inconvenientes dessa técnica, destaca-se a probabilidade da ocorrência de inibidores de reação, portanto, há necessidade da inclusão de um controle interno da reação, o chamado IAC (Internal Amplification Control). O IAC é uma seqüência não alvo, colocada na reação PCR e amplificada simultaneamente com a seqüência

alvo. Almeja-se com isso, impedir os resultados falsos negativos que possam ocorrer por inibidores da PCR (Klerks et al. 2004).

Diante do exposto, objetivou-se identificar a espécie *Staphylococcus aureus* por mPCR isolados de diferentes alimentos, tendo-se como alvo o gene da termonuclease (*nuc*) e o 16S rRNA como controle de reação e compará-los com os testes bioquímicos tradicionalmente utilizados para identificação destes patógenos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas 56 isolados de diferentes alimentos, duas cepas padrão de *S. aureus*, FRI 326 e FRI 472, como controle positivo e como controle negativo para o gene da termonuclease, que é específico para *S. aureus*, foram utilizadas as espécies *S. warneri* e *S. lugdunensis*.

A identificação dos isolados foi realizada através das características morfológicas em Ágar Baird-Parker, produção de coagulase, coloração de Gram, seguido de testes de resistência em Ágar Baird-Parker suplementado com acriflavina, conforme descrito por Roberson et al. (1992), Brito et al. (2002) e Gandra (2003).

Para a identificação das cepas por mPCR foi realizada primeiramente a extração do DNA de acordo com protocolo proposto por Matthews et al. (1997), seguido da amplificação dos genes *nuc* (458pb) e 16S rRNA (252pb), utilizado como IAC. Os produtos de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1%, contendo brometo de etídeo, e visualizados sob iluminação ultra-violeta, sendo comparados com o marcador de massa molecular 100pb DNA Ladder.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 56 isolados avaliados pelos testes bioquímicos, todos foram Gram positivos, produtores da enzima coagulase e apresentaram crescimento em ABP suplementado com acriflavina, o que, os caracteriza como *S. aureus*, já que, segundo Capurro et al. (1999), Brito et al. (2002) e Gandra (2003), o crescimento em acriflavina é altamente discriminatório para esta espécie.

Na identificação molecular por mPCR, dos 56 isolados utilizados no experimento, 41 (73,2%) obtiveram a amplificação simultânea do gene *nuc* e do IAC, sendo identificados como *S. aureus*; 12 (21,4%) somente do IAC, o que os caracteriza como *Staphylococcus spp.*; e em três (5,7%) isolados não houve a amplificação de nenhum dos fragmentos, portanto, não sendo identificados. A amplificação dos genes *nuc* e IAC foi verificada pelas cepas utilizadas como controles positivos e nos controles negativos somente a amplificação do IAC, conforme previsto.

O IAC apresentou bom potencial como marcador para o gênero *staphylococcus*, sendo positivo em 53 (94,6%) dos isolados, resultados semelhantes foram encontrados por Baron et al. (2004), Zhang et al. (2004) e Voytenko et al. (2006), que utilizaram *primers* para a região 16S do rRNA de *Estafilococos* como controle da reação e obtiveram 100% de amplificação das seqüências desse gene.

Outros autores também utilizaram o gene *nuc* como alvo para identificação molecular de *S. aureus*. Gandra (2006) relata que esse gene foi sensível para a detecção dessa bactéria, e Kalorey et al. (2007), visando caracterizar

genotipicamente 37 isolados de *S. aureus*, obtiveram a amplificação deste gene em 36 dos isolados, demonstrando novamente alta sensibilidade.

O número limitado de testes utilizados para identificação bioquímica dos isolados pode inferir resultados errôneos (Farber et al., 2001, Hussain et al., 2008), o que pode explicar a diferença nos resultados encontrados neste estudo, quando são comparadas as técnicas moleculares e bioquímicas.

4. CONCLUSÃO

Os métodos tradicionais e moleculares apresentaram bom poder de identificação de *S. aureus*, embora, faz-se necessário um número maior de testes bioquímicos para confirmação da espécie.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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**, 2004, v.67, p.2302–2305.

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**, 2002, v. 32, p. 79 – 82.

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

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

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.

GANDRA, E. A. **Identificação de *Staphylococcus aureus*, *S. hyicus* e *S. intermedius* através de testes bioquímicos e da amplificação por PCR de seqüências 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. **Multiplex PCR para detecção de *Staphylococcus aureus*, *S. intermedius* e *S. hyicus* em leite UHT artificialmente contaminado.** Pelotas, 2006. 69f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) - Faculdade de Agronomia "Eliseu Maciel", UFPel, 2006.

HUSSAIN, M., EIFF, C., SINHA, B., JOOST, I., HERRMANN, M., PETERS, G., BECKER, K. *eap* gene as novel target for specific identification of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Microbiology**, 2008, v. 46, n. 2, p. 470 – 476.

KALOREY, D. R., SHANMUGAM, Y., KURKURE, N. V., CHOUSALKAR, K. K., BARBUDDHE, S. B. PCR-based detection of genes encoding virulence determinants in *Staphylococcus aureus* from bovine subclinical mastitis cases. **Journal Veterinary Science**, 2007, v. 8, n. 2, p. 151 – 154.

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

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

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

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

VOYTENKO, A. V., KANBAR, T., ALBER, J., LA'MMLER, C.,*, WEISS, R., PRENGER-BERNINGHOFF, E., ZSCHO'CK, M., AKINEDEN, O., HASSAN, A. A., DMITRENKO, O. A. Identification of *Staphylococcus hyicus* by polymerase chain reaction mediated amplification of species specific sequences of superoxide dismutase A encoding gene *soda*. **Veterinary Microbiology**, 2006, v. 116, p. 211 – 216.

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