



# PCR PARA DETECÇÃO DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ENTEROTOXIGÊNICOS EM QUEIJO MINAS FRESCAL\*

Fernando ZOCHE\*\*  
Wladimir Padilha da SILVA\*\*\*

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

■PALAVRAS-CHAVE: Contaminação; alimento; enterotoxinas; bactéria patogênica.

## INTRODUÇÃO

O gênero *Staphylococcus* é formado por 41 espécies e 24 subespécies.<sup>8</sup> Entre as bactérias desse gênero, *Staphylococcus aureus* é a mais relacionada a casos e a surtos de intoxicação alimentar devido à capacidade de grande parte de suas cepas produzirem enterotoxinas (EE),<sup>6,28</sup> as quais, após pré-formadas e ingeridas com o alimento, podem causar sintomas tais como náuseas, vômitos, dores abdominais e diarreia.<sup>13,18</sup> Até o momento estão descritas e purificadas 22 EE, das quais dez já foram envolvidas em intoxicação alimentar (EEA, EEB, EEC<sub>1</sub>, EEC<sub>2</sub>, EEC<sub>3</sub>, EED, EEE, EEG, EEH e EEI). Embora as EE clássicas (EEA à EEE) sejam responsáveis por 95% dos surtos,<sup>31</sup> novas evidências sugerem que essa prevalência pode variar. Na Noruega, por exemplo, um estudo conduzido por Jorgensen et al.<sup>13</sup> demonstrou um surto de intoxicação alimentar estafilocócica por EEH.

A intoxicação alimentar estafilocócica causada pela ingestão de derivados lácteos é comum, sendo frequentemente reportada.<sup>4,9</sup> Um dos fatores responsáveis é o fácil acesso de *S. aureus* ao leite, uma vez que esse microrganismo é o agente mais comum de mastite bovina.<sup>5,32</sup> Embora os tratamentos térmicos comumente utilizados para sanitizar/conservar o leite assegurem a destruição das células vegetativas, estes não são suficientes para inativar as EE que, por sua vez, poderão causar intoxicação alimentar. Além disso, *S. aureus* pode ser veiculado ao leite pasteurizado, ou ao queijo, através de contaminação por meio de práticas deficientes de higiene e manipulação e, uma vez presente nesses alimentos, pode se multiplicar e produzir EE.

O queijo Minas Frescal é um alimento tradicional, muito apreciado e bastante consumido no Brasil.<sup>24</sup> Por ser um queijo semi-gordo e de muito alta umidade,<sup>24</sup> suas características podem favorecer a multiplicação de *S. aureus*, com conseqüente produção de EE. A pesquisa tradicional de estafilococos nesse alimento é usualmente realizada por meio de métodos convencionais, baseados em semeadura em meios de cultura seletivo-diferencial, seguida de testes adicionais, tais como coagulase, catalase e termonuclease.<sup>15</sup> No entanto, a realização desses testes a partir das cepas isoladas de alimentos, além de não diferenciar *S. aureus* de outras espécies de estafilococos capazes de produzir EE e de não identificar cepas enterotoxigênicas, torna laboriosa a prática laboratorial, estendendo o tempo necessário para o diagnóstico.<sup>29</sup>

Diversos trabalhos reportaram o uso da amplificação *in vitro* do DNA pela reação em cadeia da polimerase (PCR) para detecção de patógenos diretamente em alimentos.<sup>2,7,10,23</sup> Para *S. aureus*, a detecção e a genotipagem de genes de EE, a fim de que sejam utilizados como marcadores genéticos, têm sido realizadas por uniplex-PCR, multiplex-PCR e, mais recentemente, por meio de sistemas de PCR em tempo real.<sup>14, 19, 27, 30</sup> Embora essas técnicas moleculares de diagnóstico permitam a obtenção de resultados rápidos, específicos e sensíveis, quando comparadas àquelas tradicionalmente utilizadas para a detecção de *S. aureus* e de EE, sua eficácia é dependente de um procedimento de extração que permita a recuperação de um DNA puro, o que nem sempre é possível, principalmente quando se ava-

\* Trabalho elaborado com apoio financeiro CNPq (Processo 47100/04-3) e ao PRODOC também pela bolsa.

\*\* Faculdade de Agronomia – Universidade Federal da Fronteira Sul – Campus de Erechim – 99700-971 – Erechim – RS – Brasil. E-mail: Fernando.zocche@uffs.edu.br.

\*\*\* Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial – Universidade Federal de Pelotas – 96010-900 – Pelotas – RS – Brasil.

liam alimentos ricos em gordura e proteína, por exemplo, os queijos.

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

## MATERIAL E MÉTODOS

### Cepas Bacterianas

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

As cepas foram inoculadas individualmente em caldo Infusão de Cérebro e Coração (BHI - Acumedia®) e incubadas a 37°C por 18-24 horas. A determinação da concentração celular presente em BHI foi realizada por semeadura *pour plate* em ágar Padrão para Contagem (PCA - Acumedia®). Após isto, 1mL de cada cultivo de *S. aureus* em BHI foi repassado para um mesmo tubo de ensaio, totalizando 3mL. A densidade microbiana foi ajustada com solução salina 0,85% realizando-se diluições decimais seriadas, até a obtenção de concentrações celulares entre 10<sup>7</sup> a 10<sup>2</sup> UFC mL<sup>-1</sup>. As concentrações celulares obtidas foram utilizadas para a contaminação artificial do queijo minas frescal.

### Contaminação artificial do queijo minas frescal

A matriz alimentar utilizada neste estudo foi adquirida no comércio local de Pelotas, RS, e submetida à avaliação tradicional de *Staphylococcus aureus*<sup>15</sup> para confirmar a ausência de células viáveis desse microrganismo. Após, alíquotas de queijo (10g) foram fracionadas assepticamente e acondicionadas em saco plástico estéril. As amostras de 10g foram inoculadas com 10mL de solução salina 0,85% contendo um “mix” das cepas padrão de *S. aureus* (Tabela 1), de forma a se obter um queijo contaminado com concentrações bacterianas variando entre 10<sup>7</sup> e 10<sup>2</sup> UFC g<sup>-1</sup>. O conjunto foi homogeneizado manualmente durante 3 minutos até completa uniformização do conjunto.

### Extração do DNA

Para a extração do DNA de *S. aureus* utilizou-se o método descrito por Tamarapu et al.,<sup>30</sup> com modificações, adicionando-se algumas etapas propostas por Parayre et al.<sup>23</sup> Inicialmente, 10g do queijo artificialmente contaminado foram homogeneizadas com 45mL de uma solução de citrato de sódio 2%, de onde foram utilizados 10mL como unidade analítica. Após aquecimento a 50°C por 10 minutos, centrifugou-se a unidade analítica a 10.000 x g por 10 minutos em temperatura ambiente e, após a retirada do sobrenadante, suspendeu-se o *pellet* em 400µL de tampão de lise contendo Tris-HCl 50mM adicionado de EDTA 10mM e SDS 5%. A esse conteúdo adicionou-se 100µL de lisostafina (100µg mL<sup>-1</sup>, Sigma®) e 20µL de proteinase K (20mg mL<sup>-1</sup>) com posterior incubação em banho-maria a 37°C durante 1 hora. Posteriormente, adicionou-se igual volume de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) e homogeneizou-se suavemente por inversão do tubo. Após centrifugação a 16.100 x g durante 13 minutos, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e o DNA foi precipitado com 800µL de etanol absoluto gelado, permanecendo a -20°C por, no mínimo, 2 horas. Decorrido esse período, centrifugou-se a mistura a 16.100 x g durante 40 minutos a 4°C, descartou-se o sobrenadante, lavou-se o *pellet* com etanol 70% e, após centrifugação a 16.100 x g por 3 minutos a 4°C, suspendeu-se novamente o *pellet* de DNA em 30µL de água ultra pura estéril.

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

### Oligonucleotídeos iniciadores

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

### Reação em cadeia da polimerase

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

Tabela 1 – Cepas de referência utilizadas nas PCR, com os respectivos genes avaliados.

Cepas	Genes de enterotoxinas	Referência
<i>S. aureus</i> FRI*S6	<i>sea, seb</i>	Letertre et al. <sup>16</sup>
<i>S. aureus</i> FRI*361	<i>sec, sed, seg, sei, selj, selm, selo</i>	Kwon et al.; <sup>14</sup> Omoe et al.; <sup>22</sup> Hwang et al. <sup>11</sup>
<i>S. aureus</i> FRI*326	<i>see</i>	Nakayama et al. <sup>21</sup>

\* FRI – Food Research Institute

Tabela 2 – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na amplificação de fragmentos dos genes de enterotoxinas estafilocócicas.

Descrição/gene alvo	Seqüência 5' → 3'	Posição no gene	Número de acesso <sup>1</sup>	Fragmentos estimados (pb)	Referência
ESA1/ <i>sea</i>	ACGATCAATTTTACAGC	203 – 222	M18970	544	Rosec & Gigaud <sup>26</sup>
ESA2/ <i>sea</i>	TGCATGTTTTTCAGAGTTAATC	726 – 746			
ESB1/ <i>seb</i>	GAATGATATTAATTCGCATC	621 – 640	M11118	416	Rosec & Gigaud <sup>26</sup>
ESB2/ <i>seb</i>	TCTTTGTGCGTAAGATAAACTTC	1015 – 1036			
SEC1/ <i>sec</i>	GACATAAAAAGCTAGGAATTT	676 – 695	X05815	257	Nájera-Sanchez et al. <sup>19</sup>
SEC2/ <i>sec</i>	AAATCGGATTAACATTATCCA	912 – 932			
SED1/ <i>sed</i>	CAAATATATTGATATAATGA	4 – 23	M28521	330	Este estudo
SED2/ <i>sed</i>	AGTAAAAAAGAGTAATGCAA	314 – 333			
<i>Universal primer Forward for see/see</i>	TGTATGTATGGAGGTGTAAC	388 – 407	M21319	213	
<i>Reverse primer for see/see</i>	GCCAAACCTGTCTGAG	600 – 585			Sharma et al. <sup>27</sup>
<i>Universal primer Forward for selj/selj</i>	TGTATGTATGGAGGTGTAAC	1298 – 1317	AF053140	531	
<i>Reverse primer for selj/selj</i>	AGTTCACCTGACTTCAACG	1828 – 1809			Kwon et al. <sup>14</sup>
SEG1/ <i>seg</i>	TGCTATCGACACACTACAACC	*4758 – 4778		704	
SEG2/ <i>seg</i>	CCAGATTCAAATGCAGAACC	*5461 – 5442			McLauchlin et al. <sup>17</sup>
SEI1/ <i>sei</i>	GACAACAAAAGCTGCGAAACTG	*2087 – 2108		630	
SEI2/ <i>sei</i>	CCATATTCTTTGCCTTACCAG	*2716 – 2695	AF285760		
SEIM1/ <i>selm</i>	CCAATTGAAGACCACCAAAG	*1544 – 1563		517	
SEIM2/ <i>selm</i>	CTTGTCCTGTTCCAGTATCA	*2060 – 2042			Blaiotta et al. <sup>1</sup>
SEIO1/ <i>selo</i>	AGTCAAGTGTAGACCCTATT	*494 – 513		534	
SEIO2/ <i>selo</i>	TATGCTCCGAATGAGAATGA	*1027 – 1008			

<sup>1</sup> número de acesso no *GenBank*, \* posição no *enterotoxin gene cluster*.

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

A amplificação de fragmentos dos genes *see* e *selj*, continha 20pmol dos oligonucleotídeos (10pmol do *Universal Forward Primer* e 10pmol do *Reverse Primer for see* ou *Reverse Primer for selj*), solução tampão para PCR com 1,25mM de KCl e 0,5mM de Tris-HCl (pH 8,4), 4mM de cloreto de magnésio, 100µM de dNTPs mix, 1,5U de *Taq* DNA polimerase, e água ultra pura esterilizada, tota-

lizando 25µL por tubo. Foram utilizadas quantidades entre 10 e 100ng de DNA.

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

A amplificação dos fragmentos alvo foi realizada em termociclador (*MJ Research, PTC – 100, Peltier Thermal Cycler*). No programa para *sea*, *seb*, *sec* e *sed*, utilizou-se desnaturação inicial do DNA a 95°C por 5 min, seguida de 32 ciclos (95°C – 1 min, 44,5°C – 1 min e 72°C – 1 min), e de extensão final a 72°C por 10 min. Para *see* e *selj*

utilizou-se desnaturação inicial do DNA a 95°C por 5 min, seguida de 32 ciclos (95°C – 45 seg, 51°C – 45 seg e 72°C – 45 seg), e de extensão final a 72°C por 10 min. Para *seg*, *sei*, *selm* e *selo* a desnaturação inicial do DNA foi realizada a 95°C por 3 min, seguida de 30 ciclos (95°C – 10 seg e 55°C – 75 seg), e de extensão final a 72°C por 7 min.

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

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

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

Para a calibração da PCR foi necessário testar diferentes temperaturas de anelamento, das quais, 44,5°C mostrou-se a mais adequada para amplificação de *sea*, *seb*, *sec* e *sed*, 51°C para *see* e *selj*, e 55°C para *seg*, *sei*, *selm* e *selo*. Salienta-se que, mesmo nas temperaturas ideais de anelamento, ocorreu amplificação de fragmentos inespecíficos, no entanto, sua presença não interferiu na visualização dos produtos de amplificação esperados, como pode ser visualizado na Figura 1. Alimentos frescos, tal como o queijo Minas Frescal, caracterizam-se por possuir elevada microbiota intrínseca, cujo DNA pode ter favorecido a amplificação de fragmentos inespecíficos. Além disso, há alta similaridade genética entre os genes das EE,<sup>12</sup> o que, segundo Kwon et al.,<sup>14</sup> pode facilitar o anelamento inespecífico dos *primers Forward*.

Foi possível detectar, de forma específica, os genes *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *sei*, *selj*, *selm* e *selo* de

*S. aureus* a partir do DNA extraído diretamente do queijo Minas Frescal, cujos produtos de amplificação podem ser visualizados na Figura 2.

Poucos trabalhos descrevem técnicas moleculares para diagnóstico desse microrganismo diretamente em queijos, podendo-se citar, como exemplos, os realizados com queijo Cheddar,<sup>30</sup> queijo Livarot<sup>2</sup> e queijo Emmental.<sup>23</sup> Com queijo Minas Frescal, um produto típico do Brasil, não há relato na literatura. Um dos principais motivos para o baixo número de trabalhos que obtém êxito no diagnóstico direto de patógenos bacterianos em queijos é que esse alimento é rico em gorduras, proteínas, e outros componentes que podem interferir na PCR. Nesse aspecto, Tamarapu et al.<sup>30</sup> relatam que, durante o processo de extração do DNA de *S. aureus* em queijo, é necessária a eliminação da maior quantidade possível de resíduos da matriz alimentar que possam interferir na PCR, e que utilizaram para esse fim solventes orgânicos para eliminação da gordura do queijo, diferente deste estudo, em que a remoção do conteúdo lipídico foi obtida por centrifugação. Nakano et al.<sup>20</sup> e Cremonesi et al.,<sup>7</sup> também citam que íons Ca<sup>2+</sup>, proteínases, gordura e proteínas do queijo podem reduzir consideravelmente a sensibilidade da reação por dificultar o acesso da DNA polimerase ao DNA alvo, o que não foi evidenciado neste estudo, uma vez que foi possível amplificar fragmentos de todos os genes de EE testados.

Um aspecto que deve ser ressaltado neste estudo é que não houve necessidade de enriquecimento prévio da amostra e/ou de purificação da unidade analítica, o que aumentaria significativamente o tempo para a conclusão da análise. Alguns autores<sup>2,7,10,11,20,25,30</sup> que utilizaram PCR para diagnóstico de *S. aureus* diretamente em leite e derivados lácteos demonstram a necessidade dessas etapas anteriormente a extração do DNA, enquanto outros<sup>2</sup> relatam que, além do aumento do tempo necessário à conclusão da análise, houve decréscimo na quantidade de DNA recuperado e na sensibilidade da PCR.

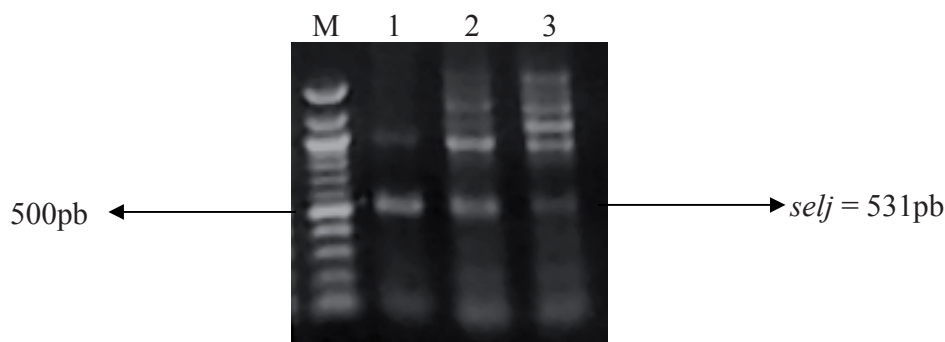


FIGURA 1 – Eletroforese em gel de agarose 1% de produtos de PCR realizada com DNA de *S. aureus*. Coluna 1: fragmento de *selj* (531pb) obtido a partir de DNA de *S. aureus* em queijo Minas Frescal inoculado com 10<sup>4</sup>UFC.g<sup>-1</sup>. Coluna 2: fragmento de *selj* (531pb) obtido a partir de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

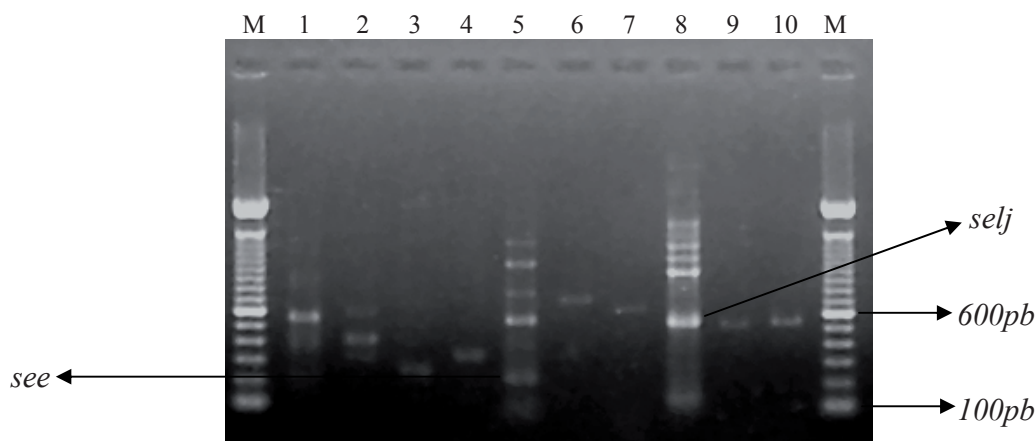


FIGURA 2 – Eletroforese em gel de agarose 1%, de produtos de PCR realizada com DNA de *S. aureus* extraído diretamente de queijo Minas Frescal inoculado com  $10^2$ UFCg<sup>-1</sup> – Coluna M: Marcador de massa molecular *Ladder* 100pb (Invitrogen®); Coluna 1: fragmento de *sea* (544pb); Coluna 2: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

A identificação de EE em alimentos é realizada, usualmente, por técnicas imunológicas.<sup>31</sup> Todos os kits baseados em reações imunoenzimáticas disponíveis no mercado para detecção de EE têm como alvo as enterotoxinas clássicas (EEA, EEB, EEC, EED e EEE) e, embora essas sejam as mais comumente envolvidas em casos e surtos de intoxicação alimentar estafilocócica, todas as EE apresentam propriedades farmacológicas semelhantes, ou seja, são capazes de causar a doença.<sup>1,12,13</sup> Dessa forma, técnicas voltadas à detecção de outras enterotoxinas e de seus genes, como proposto neste estudo (genes das EEG, EEI, EEIJ, EEIM e EEIO), apresentam relevância, uma vez que podem ser utilizadas em investigações epidemiológicas, de forma a rastrear a verdadeira incidência de cada EE na doença, bem como servir de marcadores genético-moleculares para cepas enterotoxigênicas de *S. aureus* em alimentos.

Na rotina laboratorial, a detecção de cepas de *S. aureus* em queijo Minas Frescal envolve isolamento em meios seletivo-diferenciais, seguido de testes bioquímicos,<sup>4,5,19</sup> entretanto, apesar de apresentar especificidade e sensibilidade satisfatória, é demorada, de alto custo e necessita considerável mão-de-obra.<sup>29</sup> Dessa forma há demanda pelo desenvolvimento de técnicas mais rápidas, específicas, porém, com sensibilidade suficiente para identificar se o produto apresenta-se em conformidade com a legislação. Neste estudo, a PCR proposta foi capaz de identificar amostras de queijo Minas Frescal artificialmente contaminadas nas quais *S. aureus* portadores dos genes *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *sei*, *selj*, *selm* e *selo* estavam presentes em concentrações  $\geq 10^2$  unidades formadoras de colônias por grama de queijo (UFC g<sup>-1</sup>), conforme pode ser visualizado na Figura 2.

O resultado obtido é importante, tendo em vista que o limite de detecção obtido atende ao parâmetro máximo estipulado pela legislação brasileira,<sup>3</sup> que estabelece 5 x

$10^2$ UFC g<sup>-1</sup>, para estafilococos coagulase positiva em queijo Minas Frescal. Além disso, outro aspecto que deve ser levado em consideração é que, para *S. aureus* provocar intoxicação alimentar há necessidade de uma concentração celular de, aproximadamente,  $10^5$ UFC g/mL<sup>-1</sup> de alimento, portanto, pelo menos 3log superior ao limite de detecção obtido com a PCR proposta neste estudo.

## CONCLUSÃO

Através da PCR desenvolvida foi possível amplificar os genes *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *sei*, *selj*, *selm* e *selo* quando *S. aureus* estava presente em concentrações  $\geq 10^2$ UFC g<sup>-1</sup> de queijo Minas Frescal.

ZOCHE, F.; SILVA, W. P. PCR for enterotoxigenic *staphylococcus aureus* detection in minas frescal cheese. *Alim. Nutr.*, Araraquara, v. 23, n. 2, p. 187-193, abr./jun. 2012.

■ABSTRACT: *Staphylococcus aureus* is a pathogenic microorganism frequently found in milk and dairy products. Its identification and determination of their enterotoxigenicity indicate the potential for enterotoxins (EE) production, which, after preformed and ingested with the food can cause food poisoning. However, the traditional methods of isolation and identification besides being time consuming they only infer toxigenicity. The aim of this study was to standardize a PCR for amplification of ten EE genes using DNA of *S. aureus* extracted directly from artificially contaminated Minas Frescal Cheese. Reactions were specific for *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *sei*, *selj*, *selm* and *selo* genes, showing sensitivity  $\geq 10^2$ UFC of *S. aureus*

per gram of cheese. There was amplification with DNA extracted directly from the cheese, without the need for prior enrichment of the sample, reducing the total time of analysis. With the PCR protocol proposed we can suggest that it is possible to detect toxigenic *S. aureus* in Minas Frescal Cheese when this microorganism is present in low cell concentrations.

■KEYWORDS: Contamination; food; enterotoxins; pathogenic bacteria.

## REFERÊNCIAS

- BLAIOTTA, G. et al. PCR detection of staphylococcal enterotoxin genes in *Staphylococcus* spp. strains isolated from meat and dairy products. Evidence for new variants of seG and seI in *S. aureus* AB-8802. **J. Appl. Microbiol.**, v. 97, p. 719-730, 2004.
- BONAÍTI, C.; PARAYRE, S.; IRLINGER, F. Novel extraction strategy of ribosomal RNA and genomic DNA from cheese for PCR-based investigations. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 107, p. 171-179, 2006.
- BRASIL. Resolução RDC n. 12, de 02 de Janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 10 jan. 2001. Seção 1, n. 7-E, p. 46-53.
- CARMO, L. S. et al. Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in Minas cheese and raw milk in Brazil. **Food Microbiol.**, v. 19, p. 9-14, 2002.
- CENCI-GOGA, B.T. et al. Enterotoxin production by *Staphylococcus aureus* isolated from mastitic cows. **J. Food Prot.**, v. 66, p. 1693-1696, 2003.
- CHEN, T. R.; CHIOU, C. S.; TSEN, H. Y. Use of novel PCR primers specific to the genes of staphylococcal enterotoxin G, H, I for the survey of *Staphylococcus aureus* strains isolated from food-poisoning cases and food samples in Taiwan. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 92, p. 189-197, 2004.
- CREMONESI, P. et al. Technical note: improved method for rapid DNA extraction of mastitis pathogens directly from milk. **J. Dairy Sci.**, v. 89, p. 163-169, 2006.
- EUZÉBY, J. P. **List of bacterial names with standing in nomenclature**. Disponível em: <http://www.bacterio.cict.fr/s/staphylococcus.html>. Acesso em: 04 abr. 2008.
- EVENSON, M. L. et al. Estimation of human dose of staphylococcal enterotoxin A from a large outbreaks of staphylococcal food poisoning involving chocolate milk. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 25, p. 311-316, 1988.
- GANDRA, E. A. **Multiplex PCR para detecção de *S. aureus*, *S. intermedius* e *S. hyicus* em leite UHT artificialmente contaminado**. 2006. 69f. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2006.
- HWANG, S. Y. et al. Novel multiplex PCR for the detection of the *Staphylococcus aureus* superantigen and its application to raw meat isolates in Korea. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 117, p. 99-105, 2007.
- JARRAUD, S. et al. *EGC* highly prevalent operon of enterotoxin gene, forms a putative nursery of superantigens in *Staphylococcus aureus*. **J. Immunol.**, v. 166, p. 669-677, 2001. Nota de correção em: **J. Immunol.**, v. 166, p. 4260, 2001.
- JORGENSEN, H. J. et al. An outbreak of staphylococcal food poisoning caused by enterotoxin H in mashed potato made with raw milk. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 252, p. 267-272, 2005.
- KWON, N. H. et al. Application of extended single-reaction multiplex polymerase chain reaction for toxin typing of *Staphylococcus aureus* isolates in South Korea. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 97, p. 137-145, 2004.
- LANCETTE, G. A.; BENNETT, R. W. *Staphylococcus aureus* and Staphylococcal Enterotoxins. In: AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4<sup>th</sup> ed. Washington, DC, 2001. p. 387-400.
- LETERTRE, C. et al. A strategy on 5' nuclease multiplex PCR to detect enterotoxin genes *sea* to *sej* of *Staphylococcus aureus*. **Mol. Cell. Probes**, v. 17, p. 227-235, 2003.
- McLAUCHLIN, J. et al. The detection of enterotoxins and toxic shock syndrome toxin genes in *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction. **J. Food Prot.**, v. 63, p. 479-488, 2000.
- MEHROTRA, M.; WANG, G.; JOHNSON, W. M. Multiplex PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, esfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1, and methicillin resistance. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, p. 1032-1035, 2000.
- NÁJERA-SANCHEZ, G. et al. Development of two multiplex polymerase chain reactions for the detection of enterotoxigenic strains of *Staphylococcus aureus* isolated from foods. **J. Food Prot.**, v. 66, p. 1055-1062, 2003.
- NAKANO, S. et al. PCR detection of *Bacillus* and *Staphylococcus* in various foods. **J. Food Prot.**, v. 67, p. 1271-1277, 2004.
- NAKAYAMA, A. et al. Development of a routine laboratory direct detection system of staphylococcal enterotoxin genes. **J. Med. Microbiol.**, v. 55, p. 273-277, 2006.
- OMOE, K. et al. Comprehensive analysis of classical and newly described staphylococcal superantigenic toxin genes in *Staphylococcus aureus* isolates. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 246, p. 191-198, 2005.

23. PARAYRE, S. et al. Easy DNA extraction method and optimization of PCR-thermal temperature gel electrophoresis to identify the predominant high and low GC-content bacteria from dairy products. **J. Microbiol. Methods**, v. 69, p. 431-441, 2007.
24. PERRY, K. S. P. Queijos: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. **Quím. Nova**, v. 27, p. 293-300, 2004.
25. RAMESH, A. et al. Application of a convenient DNA extraction method and multiplex PCR for the direct detection of *Staphylococcus aureus* and *Yersinia enterocolitica* in milk samples. **Mol. Cell. Probes**, v. 16, p. 307-314, 2002.
26. ROSEC, J. P.; GIGAUD, O. Staphylococcal enterotoxin genes of classical and new types detected by PCR in France. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 77, p. 61-70, 2002.
27. SHARMA, N. K.; REES, C. E. D.; DODD, C. E. R. Development of a single-reaction multiplex PCR toxin typing assay for *Staphylococcus aureus* strains. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 66, p. 1347-1353, 2000.
28. SILVA, E. R.; CARMO, L. S.; SILVA, N. Detection of the enterotoxins A, B and C genes in *Staphylococcus aureus* from goat and bovine mastitis in Brazilian dairy herds. **Vet. Microbiol.**, v. 106, p. 103-107, 2005.
29. SILVA, W. P.; GANDRA, E. A. Estafilococos coagulase positiva: patógenos de importância em alimentos. **Hig. Aliment.**, São Paulo, v. 18, n. 122, p. 32-37, 2004.
30. 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, p. 664-668, 2001.
31. VERNZOZY-ROZAND, C. et al. Comparison of three immunological methods for detecting staphylococcal enterotoxins from food. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 10, p. 1-5, 2004.
32. ZSCHÖCK, M. et al. Pattern of enterotoxin genes *seg*, *seh*, *sei* and *sej* positive *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. **Vet. Microbiol.**, v. 108, p. 243-249, 2005.

Recebido em: 14/03/2011

Aprovado em: 17/04/2012