



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
FACULDADE DE AGRONOMIA "ELISEU MACIEL"
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AGROINDUSTRIAL

**IDENTIFICAÇÃO DE *Staphylococcus aureus*, *S. intermedius* e *S. hyicus* ATRAVÉS
DE TESTES BIOQUÍMICOS E DA AMPLIFICAÇÃO POR PCR DE SEQÜÊNCIAS DOS
GENES *coa* E *nuc***

ELIEZER AVILA GANDRA

Pelotas-RS, 2003

ELIEZER AVILA GANDRA

**IDENTIFICAÇÃO DE *Staphylococcus aureus*, *S. intermedius* e *S. hyicus*
ATRAVÉS DE TESTES BIOQUÍMICOS E DA AMPLIFICAÇÃO POR PCR DE
SEQÜÊNCIAS DOS GENES *coa* E *nuc***

DISSERTAÇÃO apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial da Faculdade de Agronomia "Eliseu Maciel" da UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (M. S.).

Orientador: Prof. Dr. Wladimir Padilha da Silva

Co-Orientador: Prof. Dr. Jorge Adolfo Silva

Pelotas-RS, 2003

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Wladimir Padilha da Silva (Faculdade de Agronomia "Eliseu Maciel"-UFPEL)

Prof^a. Dra. Maria Teresa Destro (Faculdade de Ciências Farmacêuticas-USP)

Prof. Dr. José Antônio Guimarães Aleixo (Faculdade de Nutrição-UFPEL)

Prof. Dr. Jorge Adolfo Silva (Faculdade de Agronomia "Eliseu Maciel"-UFPEL)

Dedico

Para Nilo, Dulce Helena, Edgar e Espencer.

Como sempre, a base de tudo.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador e amigo, Prof. Dr. Wladimir Padilha da Silva, pela dedicação na orientação deste trabalho, pelo exemplo de profissionalismo, assim como, pela confiança, ensinamentos, apoio e incentivo, presentes em todos os momentos.

Ao meu co-orientador Jorge Adolfo Silva, pela ajuda constante e por não medir esforços para que a parte molecular deste estudo fosse desenvolvida.

À CAPES, pelo financiamento da bolsa de estudo.

Às minhas grandes amigas Márcia Ribeiro de Araújo e Márcia Magalhães Mata, minhas companheiras no desenvolvimento deste estudo, e, em especial, à Márcia Raquel Pegoraro de Macedo, pelo inestimável empenho pela efetivação deste trabalho, meu profundo agradecimento.

Às minhas queridas amigas, Andréia Saldanha de Lima e Márcia Monks Jantzen, pelas inúmeras demonstrações de amizade, apoio e companheirismo, no decorrer destes dois anos.

À Elen Nalério, pelas palavras de incentivo e pela ajuda sempre presente.

Ao amigo, Prof. Msc. Celso Medina Fagundes, pelo companheirismo, e pronto auxílio quando solicitado.

À Eduarda, Ana, Fabrício, Nádia, Gládis, Vanessa e demais amigos do MICROBIAL, que, de forma direta ou indireta, sempre estiveram presentes, me auxiliando e contribuindo para que este trabalho fosse desenvolvido.

A Aline Manke Nachtigall pela sua alegria, apoio e amizade.

Aos amigos do BIOTECNAL: Márcio Zanuzo, Luciano Lucheta e Emerson, que não mediram esforços em me auxiliar, quando solicitados.

À Tatiane da Costa pela "torcida", amizade e incentivo.

Ao Prof. Dr. Odir Dellagostin, pelo auxílio no desenho dos *primers*.

Ao Prof. Dr. Pedro Antunes, pelo auxílio no delineamento experimental deste projeto.

Aos amigos Claudio, Cristina, Silvana, Charli e Rita, pelos momentos de descontração e incentivo.

Ao Mauro, do Biotério da UFPel, pelo auxílio nas coletas de sangue.

À todos os professores e funcionários do DCTA, em especial ao amigo Fábio Padilha da Silva, pela sua valiosa ajuda, sempre com prontidão e competência.

*Exalta os caminhos que teus pés trilharam
E glorifica o que teus olhos alcançaram!
Mas tua obra só sera seara redentora,
Se à vivência juntares a ação criadora.*

(Goethe)

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE TABELAS	11
LISTA DE APÊNDICES.....	12
RESUMO.....	13
ABSTRACT	15
1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVOS	20
3 REVISÃO DE LITERATURA	21
3.1 <i>Staphylococcus</i> spp.....	21
3.2 Estafilococos coagulase positiva.....	26
3.4 Identificação e Diferenciação entre Estafilococos Coagulase Positiva.....	28
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	38
4.1 Cepas bacterianas.....	38
4.2 Diferenciação Bioquímica entre Estafilococos Coagulase Positiva	39
4.2.1 Meios de cultura, soluções, reagentes e outros	39
4.2.2 Caracterização das cepas como estafilococos coagulase positiva	39
4.2.2.1 Coloração diferencial de Gram e produção de catalase.....	40
4.2.2.2 Produção de coagulase livre	40
4.2.2.3 Produção de termonuclease (TNase).....	41
4.2.3 Provas bioquímicas utilizadas para identificação e diferenciação entre estafilococos coagulase positiva	41
4.2.3.2 Atividade hemolítica	42
4.2.3.3 Fermentação aeróbica da maltose	42
4.2.3.4 Fermentação anaeróbica do manitol	43

4.2.3.5	Produção de acetoína	43
4.2.3.6	Produção de β - galactosidase	44
4.2.3.7	Resistência a acriflavina.....	44
4.2.3.8	Atividade lipolítica em Polisorbato (Tween 80).....	45
4.3	Diferenciação Molecular entre Estafilococos Coagulase Positiva	45
4.3.1	Meios de cultura, soluções, reagentes e outros	45
4.3.2	Equipamentos	47
4.3.3	Extração de DNA.....	47
4.3.4	Quantificação do DNA.....	48
4.3.5	Amplificação de seqüências do gene coa	48
4.3.5.1	Reação PCR.....	49
4.3.6	Amplificação de seqüências do gene nuc	49
4.3.6.1	Reação PCR.....	50
4.3.7	Visualização e análise dos produtos amplificados.....	51
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	52
5.1	Diferenciação Bioquímica entre <i>S. aureus</i> , <i>S. hyicus</i> e <i>S. intermedius</i>	52
5.1.1	Caracterização das cepas de estafilococos coagulase positiva	52
5.1.2	Diferenciação entre as três espécies de estafilococos coagulase positiva	55
5.2	Diferenciação Molecular entre Estafilococos Coagulase Positiva	71
5.2.1	Amplificação de seqüências do gene coa	71
Amplificação	72	
Amplificação	73	
5.2.2	Amplificação de seqüências do gene nuc	77
5.3	Comparação entre os Métodos Bioquímico e Molecular para a Diferenciação entre os Estafilococos Coagulase Positiva.....	81
6	CONCLUSÕES	84
7	REFERÊNCIAS.....	85
	APÊNDICES.....	100

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Árvore decisória para identificação e diferenciação bioquímica entre <i>S. aureus</i> , <i>S. intermedius</i> e <i>S. hyicus</i>	69
Figura 2- Produtos de PCR obtidos com os <i>primers</i> COAG2 e COAG3.	75
Figura 3- Produtos de PCR obtidos com os <i>primers</i> COAG2 e COAG3,	75
Figura 4 - Produtos de PCR obtidos com os <i>primers</i> NUC1-NUC2.....	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Diferenciação bioquímica entre as espécies de estafilococos coagulase positiva	31
Tabela 2 - Origem de 65 cepas de estafilococos coagulase positiva isoladas da pele do úbere e do leite de vacas acometidas de mastite subclínica.....	38
Tabela 3 - Oligonucleotídios utilizados para identificação e diferenciação molecular entre <i>S. aureus</i> , <i>S. intermedius</i> e <i>S. hyicus</i> , produtos de PCR e espécies alvos.	50
Tabela 4 - Percentual de cepas com reação positiva nos testes de coloração diferencial de Gram, produção de catalase, produção de termonuclease e produção de coagulase livre.....	52
Tabela 5 – Tempo de coagulação e intensidade máxima do coágulo, no teste da coagulase livre, em 65 cepas de <i>S. aureus</i> , <i>S. hyicus</i> e <i>S. intermedius</i>	56
Tabela 6 - Identificação em nível de espécie de 65 cepas de estafilococos coagulase positiva.	58
Tabela 7- Percentual de cepas, por espécie de estafilococos coagulase positiva, com resultado positivo nos testes bioquímicos de identificação.	62
Tabela 8 - Diferenciação e identificação em nível de espécie entre 65 Estafilococos coagulase positiva, através da amplificação por PCR de seqüências específicas dos genes <i>coa</i> e <i>nuc</i>	72
Tabela 9 – Diferenciação entre 65 cepas de Estafilococos coagulase positiva, através dos testes da resistência a acriflavina, da produção de β -galactosidade e da amplificação por PCR de seqüências dos genes <i>coa</i> e <i>nuc</i>	82

LISTA DE APÊNDICES

APÊNDICE A - Produtos de PCR obtidos com os *Primers* COAG2 e COAG3.....101

RESUMO

Staphylococcus aureus foi considerada, por muitos anos, a única espécie do gênero *Staphylococcus* com capacidade de produzir enterotoxinas e coagulase. Posteriormente, outras espécies produtoras de enterotoxinas e de coagulase, tais como *S. hyicus* e *S. intermedius*, foram identificadas. Estas três espécies apresentam características morfológicas, bem como reações bioquímicas, extremamente semelhantes, o que torna difícil sua diferenciação através dos métodos convencionais de análise microbiológica. O desenvolvimento das técnicas de biologia molecular, como a amplificação de DNA *in vitro*, pela reação em cadeia da polimerase (PCR–*polymerase chain reaction*), viabilizaram diversos estudos na busca de métodos mais eficazes de identificação e caracterização de microrganismos. Este trabalho teve como objetivo comparar um método bioquímico com um método molecular, baseado em PCR, para a identificação de *S. aureus*, *S. intermedius* e *S. hyicus*. Sessenta e cinco cepas de Estafilococos coagulase positiva, previamente submetidas aos testes da coloração de Gram, produção de catalase, de termonuclease e de coagulase livre, foram diferenciadas e identificadas em nível de espécie, através de análise bioquímica, utilizando os testes da produção de pigmentos, atividade hemolítica em ágar sangue, produção de β -galactosidase, produção de acetoína, fermentação aeróbica da maltose, fermentação anaeróbica do manitol, atividade lipolítica em polisorbato, crescimento em ágar Baird-Parker e ágar P suplementados com acriflavina, bem como através da amplificação por PCR de seqüências do gene *coa*, específicas para *S. aureus*, e do gene *nuc*, específicas para *S. intermedius* e para *S. hyicus*. A combinação dos testes bioquímicos, assim como a amplificação de seqüências dos genes *coa* e *nuc*, possibilitaram a identificação e diferenciação entre as três espécies de estafilococos coagulase

positiva. Devido a variabilidade de resultados dos testes bioquímicos, concluiu-se que estes podem ser utilizados para diferenciação das três espécies, somente quando aplicados e analisados em conjunto. Os testes da resistência a acriflavina e da produção de β -galactosidase não apresentaram variabilidade de resultados, constituindo-se como os melhores testes bioquímicos de diferenciação. A amplificação por PCR de seqüências dos genes *coa* e *nuc*, com os *primers* COAG2, COAG3, NUC1, NUC2, NUC3 e NUC4, possibilitou a identificação e diferenciação entre as espécies *S. aureus*, *S. hyicus* e *S. intermedius*. Não foram verificadas diferenças no poder discriminatório usando a combinação dos testes bioquímicos ou a amplificação por PCR de seqüências dos genes *coa* e *nuc*.

ABSTRACT

Staphylococcus aureus was considered, for many years, the only species of the *Staphylococcus* genus with capacity to produce enterotoxins and coagulase. Later, other enterotoxin and coagulase producing species, such as *S. hyicus* and *S. intermedius*, had been identified. These three species have extremely similar morphologic characteristics, as well as biochemical reactions, making their differentiation difficult through the conventional methods of microbiological analysis. The development of modern molecular biology techniques, such as *in vitro* amplification of DNA through the polymerase chain reaction (PCR), allowed several studies in the search of more efficient methods for identification and characterization of microorganisms. Objective of this work was to compare a biochemical method and a molecular method, based in PCR, for the identification of *S. aureus*, *S. intermedius* and *S. hyicus*. Sixty five strains of coagulase positive staphylococci, previously submitted to tests of Gram staining, catalase, thermonuclease and free coagulase production, were differentiated and identified at species level through biochemical analysis, using the tests of pigment production, hemolytic activity in blood agar, production of β -galactosidase, acetoin production, aerobic fermentation of maltose, anaerobic fermentation of manitol, lipolytic activity in polisorbate, growth in Baird-Parker agar and P agar supplemented with acriflavina, as well as through the PCR amplification of a specific *S. aureus* *coa* gene sequence and specific *S. intermedius* and *S. hyicus* *nuc* gene sequences. The combination of biochemical testes, as well as the amplification of *coa* and *nuc* gene sequences, allowed the identification and differentiation between the three species of coagulase positive staphylococci. Due to the variability of results of biochemical tests, it was concluded that they can be used for differentiation of the three species when applied and analyzed together. The tests

for acriflavina resistance and β -galactosidase production showed no variability of results, being the best biochemical differentiation tests. The PCR amplification of *coa* and *nuc* genes sequences, with primers COAG2, COAG3, NUC1, NUC2, NUC3 and NUC4, allowed *S. aureus*, *S. intermedius* and *S. hyicus* species identification and differentiation. Differences on the discriminatory power were not verified using the combination of biochemical tests or the molecular method that uses the PCR amplification of the *coa* and *nuc* genes sequences.

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Staphylococcus* é formado, atualmente, por 32 espécies. Destas, *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. Na literatura são descritos inúmeros surtos de intoxicação alimentar causados pela ingestão de alimentos contendo enterotoxinas estafilocócicas pré-formadas. Em função do risco à saúde pública que sua presença representa em alimentos, estabeleceu-se, em diversos países, a obrigatoriedade de sua pesquisa e enumeração, como parte das ações de fiscalização sanitária de órgãos governamentais.

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. 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 estas duas espécies. Em função destes fatores, bem como da grande semelhança fenotípica entre estas três espécies de *Staphylococcus*, houve uma mudança na legislação brasileira, que passou a estabelecer a pesquisa e enumeração de estafilococos coagulase positiva ao invés da enumeração de *S. aureus*.

Estas três espécies microbianas apresentam características morfológicas em meios de cultivo diferenciais, bem como reações bioquímicas, extremamente semelhantes, o que torna difícil sua diferenciação. Na rotina laboratorial, tanto em análises de alimentos quanto em análises clínicas, o teste de coagulase em tubo (coagulase livre) é o método padrão empregado para identificar e classificar *Staphylococcus* como coagulase positiva e, muitas vezes, o único teste utilizado para identificar um isolado como sendo *S. aureus*. Entretanto, este procedimento não permite diferenciar *S. aureus* de *S. intermedius* nem de *S. hyicus*, porém, a diferenciação entre estas espécies é importante, tanto do ponto de vista epidemiológico, quanto nas pesquisas desenvolvidas para a identificação de cada um destes microrganismos.

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*), que permite obter, rapidamente, grandes quantidades de cópias de um segmento de DNA específico, vieram potencializar métodos de análise baseados em seqüências de ácidos nucleicos. A aplicação dessas metodologias originou diversos estudos na busca de métodos mais eficazes de diferenciação e identificação de microrganismos.

Diversos trabalhos sugerem a utilização da amplificação, por PCR, de seqüências específicas do genoma microbiano para serem utilizadas como marcadores genéticos, como uma alternativa viável aos métodos morfológicos e bioquímicos tradicionalmente utilizados. Para *S. aureus* já foram utilizados, entre outros, o gene *coa* (que codifica a produção da coagulase), o gene *spa* (que codifica proteína A), o gene *mecA* (que codifica a resistência a antibióticos β -lactâmicos) e a região entre 16s e 23s do operon do RNA ribossômico, entretanto, para as demais espécies de estafilococos coagulase positiva, poucos estudos moleculares foram realizados até o momento.

Neste trabalho é feita a comparação entre um método bioquímico e um método molecular para a identificação e caracterização de três espécies de estafilococos coagulase positiva. Para *S. aureus* foi utilizada a amplificação, por PCR, de seqüências do gene *coa* e, para *S. intermedius* e *S. hyicus*, do gene *nuc*, que codifica a produção de endonuclease termoestável (termonuclease).

2 OBJETIVOS

- a) estudar metodologia mais específica e precisa para a diferenciação e identificação de três espécies de estafilococos coagulase positiva;

- b) avaliar e comparar um método bioquímico com um método molecular, baseado em PCR, para identificação e diferenciação das espécies *S. aureus*, *S. intermedius* e *S. hyicus*.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 *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, provavelmente, 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 (apud LEVY, 1997) reconhecia apenas três espécies de importância clínica, utilizando como característica diferencial a prova da coagulase: a) coagulase-positiva - *S. aureus*; b) coagulase-negativa - *S. epidermidis* e *S. saprophyticus*. Atualmente, o gênero *Staphylococcus* é composto por 32 espécies e 15 subespécies (KLOOS & BANNERMAN, 1999).

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; SILVA, 1998; 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 (JAY, 1992; FRAZIER & WESTHOFF, 1993; SILVA *et al.* 1997). Jay (1992), 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 que 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, o grupo dos estafilococos coagulase positiva (capazes de produzir a enzima coagulase) são os mais importantes em relação as demais espécies do gênero, pelas seguintes razões: primeiro, porque sua presença em alimentos processados 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 de aminoácidos, estrutura molecular e atividades farmacológicas são semelhantes entre si, possuindo, entretanto, propriedades imunológicas distintas. Resistem à ação de enzimas proteolíticas, característica que explica a capacidade de permanecerem ativas após sua ingestão, bem como em certos alimentos, resistindo a ação de enzimas produzidas por outros microrganismos e a enzimas do próprio alimento (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 (1992) 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) e enterotoxina estafilocócica K (EEK) (BALABAN & RASOOLY, 2000). 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 μg de enterotoxina por quilo de peso corpóreo. Jay (1992) relata que 200 ng 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 μg /100 g de alimento, ou menos.

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; JAY, 1992; FRAZIER & WESTHOFF, 1993; FRANCO & LANDGRAF, 2002).

Além das enterotoxinas, algumas enzimas são produzidas, como fatores de virulência, por determinadas espécies de estafilococos e são utilizadas no diagnóstico laboratorial para identificação deste gênero microbiano ou de suas espécies. Entre estas enzimas, destacam-se a catalase, a termonuclease e a coagulase. A catalase atua inativando o peróxido de hidrogênio e radicais livres tóxicos formados pelo sistema mieloperoxidase no interior das células fagocitárias e é utilizada para diferenciar *Staphylococcus* de *Streptococcus*. A termonuclease ou endonuclease termoestável (TNase) é uma fosfodiesterase com propriedades endo e exonucleolítica (HALPIN-DOHNALEK & MARTH, 1989). Esta enzima pode clivar

DNA ou RNA para produzir 3`-fosfomononucleotídios, é produzida pela maioria das cepas de *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 & BANNERMAN 1999). Estruturalmente é uma proteína globular compacta, consistindo de uma única cadeia de polipeptídica, podendo ser isolada na superfície da parede celular ou próxima dessa. O aquecimento desta enzima a 65°C causa mudança estrutural, mas essas mudanças podem ser rapidamente e completamente reversíveis. A presença da termonuclease em alimentos é usada como uma medida indireta do crescimento de *S. aureus*, podendo também indicar a presença de enterotoxinas (HALPIN-DOHNALEK & MARTH, 1989).

Com relação a coagulase extracelular, sete diferentes tipos antigenicos tem sido obtidos, mas o único "papel patogênico" desempenhado por esta enzima é a formação de coágulos afim de inibir a fagocitose (HALPIN-DOHNALEK & MARTH, 1989). deve-se salientar que algumas espécies de estafilococos apresentam dois tipos: a coagulase livre, enzima extracelular que cataliza a reação entre uma substância presente no plasma, denominada de "fator de reação de coagulase (CRF)" e o fibrinogênio, formando fibrina, e a coagulase ligada, presente na superfície da parede celular bacteriana, que reage diretamente com o fibrinogênio presente no plasma, produzindo uma rápida aglutinação das células bacterianas. Tanto a coagulase livre como a ligada podem recobrir as células bacterianas com fibrina e torna-las resistentes a opsonização e a fagocitose, diminuindo a concentração de fibrinogênio no sangue circulante (HALPIN-DOHNALEK & MARTH, 1989; KLOOS & BANNERMAN, 1999; KONEMAN et al., 2000). A coagulase não atua sozinha, mas como uma co-participante com outras toxinas estafilocócicas e fatores celulares em um fenômeno complexo de patogenicidade (HALPIN-DOHNALEK & MARTH, 1989).

3.2 Estafilococos coagulase positiva

Entre as 32 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). Destas cinco espécies, três (*S. aureus*, *S. intermedius* e *S. hyicus*) foram descritas como produtoras de enterotoxinas e associadas a surtos de intoxicação alimentar. Além disto, estas três espécies apresentam outras semelhanças, como a capacidade de produzirem a enzima termonuclease (JAY, 1992; KLOOS & BANNERMAN, 1999; KONEMAM et al., 2000). 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., 2000).

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 este microrganismo (CRABTREE & LITTERER, 1934; SHAUGNESSY & GRUBB, 1937; CAUDIL & MEYER, 1943; MINOR & MARTH, 1972; MINOR & MARTH, 1976; GALBRAITH et al., 1982; JAY, 1992; SU & WONG, 1997; KLOOS & BANNERMAN, 1999; KONEMAM et al., 2000). 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., 2000). Por estas razões, os manipuladores de alimentos podem tornar-se portadores assintomáticos, possibilitando que esse microrganismo se dissemine dentro de plantas de processamento (BANDEIRA 2001; HAJDENWURCEL, 1998). 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, pode possibilitar 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, 1992; KONEMAM et al., 2000). Essa bactéria foi isolada de feridas infectadas em seres humanos, causadas por mordeduras de cães, sendo também isolada em casos de mastite bovina (KONEMAM et al., 2000; BANDEIRA, 2001), embora a sua participação na etiologia da mastite ainda não tenha sido estabelecida e elucidada (ROBERSON et al., 1992). Segundo Jay (1992), *S. intermedius*, assim como *S. aureus*, apresenta a capacidade de produzir enterotoxinas. Em um estudo com 73 cepas isoladas em cães, 52 foram identificados como *S. intermedius* e, destes, todos produziram coagulase livre (coagulase extracelular) 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 (KAMBHATI et al., 1994; WADENESH 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., 2000). 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 (1992) 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 a existência de cepas de *S. hyicus* coagulase positiva, que produziam EEA, EEB, EEC, EED e EEE.

3.4 Identificação e Diferenciação entre Estafilococos Coagulase Positiva

A identificação de microrganismos patogênicos, como estafilococos coagulase positiva (ECP), é importante tanto para o controle como para a prevenção de doenças de origem alimentar (JAYARAO *et al.*, 1996). 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 (VANDERZANT E SPLITTSTOESSER, 1992; SILVA *et al.*, 1997). 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 de produção da coagulase livre e termonuclease (VANDERZANT E SPLITTSTOESSER, 1992; MATOS *et al.*, 1995; SILVA *et al.*, 1997). O teste da produção de coagulase livre é considerado padrão para a identificação de *S. aureus* e o teste da termonuclease também é 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 a *S. aureus* começou com a descoberta de que outras espécies, como *S. hyicus* e *S. intermedius*, apresentavam capacidade de produzir enterotoxinas. Além disso, estes três microrganismos produzem coagulase e termonuclease e apresentam características morfológicas muito semelhantes, 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, 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.*, 2001).

Diversos trabalhos que utilizam testes bioquímicos para discriminar estafilococos coagulase positiva de interesse em alimentos têm sido publicados.

Roberson *et al.* (1992) e Brito *et al.* (2002) buscaram determinar um número mínimo de testes bioquímicos que pudessem ser utilizados para identificar e diferenciar *S. aureus*, *S. intermedius* e *S. hyicus* e verificaram que 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 acetoína, a produção de ácido a partir da maltose e a atividade da hialuronidase seriam os melhores testes para diferenciarem *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 são expostas na Tab. 2.

Tabela 1 – Diferenciação bioquímica entre as espécies de estafilococos coagulase positiva

Espécie	Pig ^b	Coa ^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> subesp. <i>schleiferi</i>	-	-	+	+	(+)	(+)	+	-	-	ND	ND	ND	ND	ND
<i>S. schleiferi</i> subesp. <i>coagulans</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	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+

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

^b Produção de pigmentos carotenóides.

^c Produção de coagulase livre.

^d Produção de coagulase ligada.

^e Produção de endonuclease termoestável (termonuclease ou TNase)

^f Atividade hemolítica em ágar sangue de carneiro 5%.

^g Produção de β-galactosidase.

^h Produção de acetoina.

ⁱ Fermentação aeróbica do manitol.

^j Fermentação aeróbica da maltose.

^k Fermentação anaeróbica do manitol.

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

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

ⁿ Atividade hemolítica em ágar chocolate.

^o Atividade 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 elevado.

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; MARLONY *et al.*, 2002).

A reação em cadeia da polimerase é uma técnica altamente sensível, por meio da qual, diminutas 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 de 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 oligonucleotídios 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 a PCR tornou-se o método genético mais utilizado em diagnóstico microbiológico (BOER & BEUMER, 1999; MARLONY *et al.*, 2002).

A introdução de PCR em diagnóstico microbiano estabeleceu uma alternativa viável aos métodos tradicionais de cultura (MARLONY *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 do método 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 (MARLONY *et al.*, 2002). Uma outra desvantagem está na complexidade do método, principalmente para ser utilizado 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 (KONEMAM *et al.*, 2001). 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). Outras técnicas de amplificação 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 seqüência que se encontra dentro da seqüência 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 estringência, não sendo necessário o conhecimento prévio da região de ligação do *primer* (TANG & PERSING, 1999).

Outra técnica molecular de interesse para o diagnóstico de microrganismos é o PCR multiplex, 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, teoricamente, utilizada para amplificar, de modo simultâneo, seqüências alvo de diferentes microrganismos patogênicos em uma única reação, tendo, portanto, potencial para ser utilizada em laboratórios clínicos (KONEMAM et al., 2001; TANG & PERSING, 1999).

O aprimoramento de metodologias baseadas em PCR possibilitou a inserção destas 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; MARLONY 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 utilizadas 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 (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 geralmente em uma cuba hexagonal, com 24 eletrodos, que permite uma separação mais efetiva dos fragmentos (FARBER et al., 2001; KONEMAM et al., 2001; TANG & PERSING, 1999). 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, com a enzima de restrição *AluI* (GOH *et al.*, 1992; SCHWARZKOPF & KARCH, 1994; AARESTRUP *et al.*, 1995; HOOKEY *et al.*, 1998; MOTTA. *et al.*, 2001). Também tem sido utilizada a análise de diversos genes como região X do gene da proteína A (*spa*) (FRÉNAY *et al.*, 1996; VAN BELKUN *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.

Alguns trabalhos buscaram comparar a metodologia tradicional com as metodologias moleculares para tipificação de *S. aureus*, como, por exemplo, os trabalhos de Tenover *et al.* (1994) e Lange *et al.* (1999). Para os primeiros autores, as técnicas moleculares (análise de plasmídios submetidos a clivagem com enzimas de restrição, análise de fragmentos de restrição do gene da coagulase através de PFGE, ribotipificação e eletroforese de enzimas multilocus) foram mais efetivas para diferenciação entre grupos de cepas causadoras de surtos de intoxicação alimentar, do que as técnicas convencionais (sensibilidade a antimicrobianos, fagotipagem e biotipificação), apesar de que nenhuma das técnicas moleculares apresentou poder discriminatório significativamente superior a outra. Lange *et al.* (1999) avaliaram o poder discriminatório de vários métodos de tipificação através de um coeficiente de diferenciação e verificaram maior poder discriminatório para a análise de fragmentos de macrorestrição, seguido, em ordem decrescente de poder discriminatório, pela análise das regiões entre 16s e 23s do operon do rRNA e das regiões variáveis dos genes *coa* e *spa*. A menor capacidade de discriminação, também em ordem decrescente, foi apresentada pela caracterização bioquímica, análise do perfil plasmidial e teste de resistência a antimicrobianos.

Outra técnica já 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*, usado no trabalho de Yugueros et al. (2001). Nos últimos anos também têm sido desenvolvidos inúmeros trabalhos para a caracterização e identificação molecular de *S. aureus* resistentes a metilicina, utilizando, principalmente, RFLP e PCR multiplex (BARSKI et al., 1996; NAWAS et al., 1998; LOUREIRO et al., 2000).

Trabalhos sobre a detecção e identificação de *S. aureus* presentes em leite e derivados, utilizando diversas técnicas moleculares, também foram encontrados na literatura consultada. Como exemplos, podemos citar as pesquisas de Tamarapu et al. (2001), que desenvolveram um PCR multiplex para detecção de cepas de *S. aureus* diretamente em leite bovino e em queijo cheddar, através da amplificação de seqüências do gene *nuc* (que expressa a produção da enzima termonuclease) e do gene *entC* (que expressa a produção da enterotoxina C). 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 de um gene que codifica a formação 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 e de Takeuchi et al. (1999), 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.

Em todos esses trabalhos ficou clara a aplicabilidade das técnicas moleculares para caracterização 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 diferenciação entre *S. aureus*, *S. hyicus* e *S. intermedius*, foram encontrados. Pode-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* e 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.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Cepas bacterianas

Foram utilizadas 65 cepas, previamente identificadas como ECP, pertencentes 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 isoladas da pele do úbere e do leite de vacas acometidas de mastite subclínica (BANDEIRA, 2001) e mantidas em Ágar Conservação (AC, ANTONIOLLO, 2001), sob temperatura de refrigeração ($\leq 4^{\circ}\text{C}$), até o momento do uso. A origens das cepas utilizadas são mostradas na Tab. 2.

Tabela 2 - Origem de 65 cepas de estafilococos coagulase positiva isoladas da pele do úbere e do leite de vacas acometidas de mastite subclínica

Número das cepas	Origem
1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 37, 38, 39, 40, 42, 45, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60.	Leite
9, 21, 34, 35, 36, 41, 43, 44, 46, 61, 62, 63, 64, 65.	Pele

4.2 Diferenciação Bioquímica entre Estafilococos Coagulase Positiva

4.2.1 Meios de cultura, soluções, reagentes e outros

- a) acriflavina, Sigma;
- b) ágar Baird-Parker (ABP), Oxoid, suplementado com solução aquosa de telurito de potássio a 1% e de solução ovo-salina (LANCETTE & TATINI, 1992);
- c) ágar DNA azul de toluidina (LANCETTE & TATINI, 1992);
- d) ágar Infusão Cérebro Coração (BHA) (GILL *et al.*, 1994);
- e) ágar P (CHAPIN & MURRAY, 1999);
- f) caldo Púrpura de Bromocresol, Oxoid;
- g) ágar Sangue de carneiro 5% (SILVA *et al.*, 1997);
- h) ágar Tríplice açúcar e Ferro (TSI), Merck;
- i) ágar Tripticase de Soja (TSA), Merck;
- j) ágar Tween 80 (OLIVEIRA, 2000);
- k) álcool etílico absoluto, Nuclear;
- l) caldo Infusão Cérebro Coração (BHI), Merck;
- m) caldo Metil Red –Voges Proskauer (MR-VP), Oxoid;
- n) caldo ONPG (MURRAY *et al.*, 1999);
- o) hidróxido de potássio (KOH) , Fatec;
- p) ortonitrofenil- β -D-galactopiranosídeo (ONPG), Sigma.
- q) solução 10 % (p/v) de maltose (Silva *et al.*, 1997);
- r) solução 10 % (p/v) de manitol (Silva *et al.*, 1997);
- t) α -naftol, Fatec.

4.2.2 Caracterização das cepas como estafilococos coagulase positiva

Foram realizados os testes de coloração diferencial de Gram, produção de catalase, de coagulase livre e de termonuclease para confirmação dos isolados

como ECP e para verificar a possível ocorrência de contaminações no período de manutenção dos isolados em AC. Foi utilizada uma cepa padrão de *S. aureus* como controle positivo (ATCC 10832) e, nos testes de produção de termonuclease e de coagulase livre, foi utilizada uma cepa de *S. epidermidis* como controle negativo.

4.2.2.1 Coloração diferencial de Gram e produção de catalase

Foram realizados de acordo com os procedimentos propostos por Konemam *et al.* (2000).

4.2.2.2 Produção de coagulase livre

O teste foi realizado de acordo com metodologia proposta pela AOAC (1990). Foi utilizado plasma de sangue de coelho, coletado através da técnica de punção cardíaca em animais pertencentes ao Biotério da UFPel. Após assepsia da região torácica do coelho com álcool 70 %, iodado, o sangue foi coletado com seringa descartável estéril (volume de 20 mL) e repassado para tubos previamente esterilizados, contendo citrato de sódio 1 % (p/v), como anticoagulante, na proporção de 0,2 mL de citrato para 0,8 mL de sangue. Logo após a coleta, os tubos foram acondicionados em caixa isotérmica contendo gelo e levados, imediatamente, para o MICROBIAL.

O plasma foi separado por centrifugação a 1500 rpm (centrífuga Fanem Excelsa II/mod) e aliquoteado (0,3 mL) para tubos de microcentrifuga de 1,5 mL (tipo Eppendorff) estéreis, sendo mantido sob refrigeração ($\leq 4^{\circ}\text{C}$) até o momento do uso. Para a realização do teste, tubos com caldo BHI (3 mL) foram inoculados com uma alça carregada de um cultivo recente em TSA da cepa a ser identificada e submetidos a incubação a 37°C por 24 horas. Foi, então, transferidos 0,5 mL de BHI de cada cultura a ser testada para os microtubos contendo 0,3 mL do plasma de

coelho, que foram incubados a 37°C. As leituras foram realizadas em intervalos de uma hora, por um período de oito horas, com uma leitura final 24 horas após a inoculação. A leitura foi realizada de acordo com Lancette & Tatini (1992), avaliando-se a intensidade do coágulo formado e considerando-se como positivas as culturas com resultados entre 3+ e 4+. Aquelas que apresentavam reações de nível 1+ ou 2+ foram aceitas, apenas, quando apresentaram resultados positivos nos testes adicionais da catalase, termonuclease e Gram.

4.2.2.3 Produção de termonuclease (TNase)

O teste foi realizado seguindo as recomendações e critérios propostos por SILVA et al. (1997). Tubos de ensaio contendo crescimento bacteriano de 24 horas a 37°C, em caldo BHI, foram submetidos ao aquecimento por 15 minutos, em banho-maria fervente. Após, foram inoculados 20 µL de cada cultura, em nove orifícios previamente preparados em ágar DNA Azul de Toluidina e as placas de petri, contendo o ágar, foram incubadas à temperatura de 50°C por 2 horas. Passado o período de incubação, foram consideradas produtoras de TNase, aquelas culturas que apresentavam um halo róseo estendendo-se por, pelo menos, 1 mm ao redor dos orifícios.

4.2.3 Provas bioquímicas utilizadas para identificação e diferenciação entre estafilococos coagulase positiva

As cepas Gram positivas, que apresentavam reação positiva para produção de catalase, coagulase livre e/ou termonuclease, foram selecionadas e submetidas a diferenciação bioquímica. A escolha dos testes bioquímicos foi baseada nos trabalhos de Roberson et al. (1992), Bascomb & Manafi, (1998), Kloos & Bannerman (1999) e Oliveira (2000). Utilizou-se, como controle, uma cepa padrão de *S. aureus*

(ATCC 10832) e cepas de origem clínica de *S. intermedius* e *S. hyicus*. Todas as cepas foram submetidas a todos os testes bioquímicos.

4.2.3.1 Produção de pigmentos

As cepas foram inoculadas em ágar BHA e incubadas a 37°C por 5 dias. Para interpretação dos resultados foram seguidos os critérios propostos por Kloos & Bannerman (1999), considerando-se como positivas aquelas que produziam pigmentos carotenóides, com coloração variando do amarelo ao laranja. A ausência dessa coloração foi considerada resultado negativo.

4.2.3.2 Atividade hemolítica

Para a realização deste teste seguiram-se, com algumas modificações, as recomendações de Konemam *et al.* (2000) e Murray *et al.* (1999). Prepararam-se placas de petri contendo Ágar Sangue de carneiro 5 %, que foram demarcadas na parte externa inferior, de maneira a dividir a placa em quatro espaços iguais onde, em cada espaço, estriava-se aproximadamente 1cm da cepa a ser testada. Após, as placas foram submetidas a incubação a 37°C por 24 a 48 horas e a verificação do resultado foi realizada através de observação visual de zonas claras (hemólise) ao redor do crescimento (resultado positivo) ou da ausência dessas, sem alteração do meio (resultado negativo).

4.2.3.3 Fermentação aeróbica da maltose

Preparou-se uma solução 10 % de maltose (p/v), que foi esterilizada por filtração (Filtro Millex, poro 0,22 µm, Millipore). Esta solução foi adicionada a Ágar

Púrpura de Bromocresol, de forma a obter uma concentração final de 1 % do açúcar. Da mesma maneira que na atividade hemolítica, o plaqueamento foi realizado em placas demarcadas na parte inferior, divididas em quatro espaços iguais, onde cada espaço foi inoculado com uma das culturas através de uma estria de aproximadamente 1 cm. Após período de incubação a 37°C por até 72 horas, o surgimento de coloração amarela sobre a estria ou formação de um halo amarelo ao redor da estria, era indicativo de fermentação do carboidrato com produção de ácido, sendo considerado resultado positivo (SILVA *et al.*, 1997; BANDEIRA, 2001)

4.2.3.4 Fermentação anaeróbica do manitol

Para a realização deste teste seguiram-se, com algumas modificações, os procedimentos propostos por Roberson *et al.* (1992). De forma semelhante à fermentação aeróbica da maltose, preparou-se uma solução 10 % (p/v) de manitol, que foi esterilizada por filtração (Filtro Millex, poro 0,22 µm, Millipore) e adicionou-se ao Caldo Púrpura de Bromocresol, de forma a obter uma concentração final de 1 % do açúcar. Esse meio foi aliquoteado (4 mL) para tubos de ensaio esterilizados e inoculado, imediatamente, com uma alça carregada de um cultivo recente (24 horas) em TSA. Adicionou-se óleo mineral, de maneira que formasse uma coluna com 1 cm de altura acima do meio e incubou-se a 37°C, por cinco dias. A mudança na cor do meio, de púrpura para amarelo, era indicativa de fermentação do carboidrato e de resultado positivo.

4.2.3.5 Produção de acetoína

A produção de acetoína foi detectada em tubos de ensaio contendo 1,0 mL de caldo MR-VP, para onde uma alça carregada de um cultivo recente em TSA era repassada. Após 48 horas de incubação a 37°C, foi feita a leitura, adicionando-se 0,6 mL de α -naftol 5 % (p/v) em álcool absoluto e 0,2 mL de KOH a 40 % (p/v). A

positividade da prova era demonstrada pelo aparecimento de um anel róseo na parte superior do meio de cultura. A formação do anel ocorre pela reação da acetoína, formada a partir da glicose presente no meio, com o KOH, tendo como produto o diacetil que, por sua vez, reage com o α -naftol (catalizador) e com arginina, resultando em um produto (grupo granidina-diacetila) de cor variando entre o rosa e o vermelho. A ausência deste halo, com a manutenção da cor original do meio, indicava resultado negativo (CHAPIN & MURRAY, 1999).

4.2.3.6 Produção de β - galactosidase

A produção de β -galactosidase foi determinada de acordo com Murray *et al.* (1999), empregando-se como substrato o ortonitrofenil- β -D-galactopiranosídeo (ONPG). Inoculou-se uma alçada carregada de um cultivo recente (24 horas) em TSI, em 0,5 mL de caldo ONPG e incubou-se em banho maria a 37°C por uma hora. Os resultados foram interpretados baseados na mudança de cor do meio, de incolor para amarelo (resultado positivo), ou pela ausência de mudança de coloração (resultado negativo). Seguindo as recomendações de Brito *et al.* (2002), utilizou-se um cultivo da bactéria *Escherichia coli* como controle positivo.

4.2.3.7 Resistência a acriflavina

Ágar P e ABP foram preparados e suplementados com acriflavina (após esterilização e antes do plaqueamento), de modo a obter uma concentração final de 7 μ g de acriflavina por mililitro de meio. Ágar P e ABP, com e sem a suplementação com acriflavina, foram inoculados por esgotamento com um crescimento bacteriano (24 horas a 37°C em caldo BHI) e incubados a 37°C por 24 e 48 horas. Culturas que cresceram apenas nos ágares sem acriflavina foram consideradas sensíveis, indicando resultado negativo (ROBERSON *et al.*, 1992).

4.2.3.8 Atividade lipolítica em Polisorbato (Tween 80)

A partir de um crescimento bacteriano em caldo BHI (24 h a 37°C), foram inoculadas, por esgotamento, placas contendo ágar Tween 80, que foram incubadas a 37°C, por 24 a 48 h. A presença de um halo de opacidade circundando a colônia indicava atividade lipolítica no substrato testado (OLIVEIRA, 2000).

4.3 Diferenciação Molecular entre Estafilococos Coagulase Positiva

A diferenciação molecular foi realizada através da amplificação, por PCR, de seqüências do gene *coa* específicas para *S. aureus* e do gene *nuc* específicas para *S. hyicus* e *S. intermedius*.

4.3.1 Meios de cultura, soluções, reagentes e outros

- a) ágar Trypticase de Soja (TSA), Merck;
- b) solução tampão 10 X para PCR, sem magnésio, Pharmacia;
- c) solução 2,0 mM de cloreto de magnésio, Pharmacia;
- d) solução de 200 µM de cada dNTP, Gibco BRL;
- e) solução de *Taq* DNA polimerase, Pharmacia, 5U.µL⁻¹,
- f) 1 µM de cada um dos “*primers*” (sintetizados por Invitrogen/Gibco BRL),
 - COAG2: 5´ ACCACAAGGTACTGAATCAACG 3´;
 - COAG3: 5´ TGCTTTCGATTGTTTCGATGC 3´;
 - NUC1: 5´GCCCCTGCAATGAGAGG 3´;
 - NUC2: 5´CGGACCACTTTCCGTC 3´;
 - NUC3: 5´CGCCGTTCTCTCTTTGG 3´;
 - NUC4: 5´CGCCTCTCACATCCG 3´;

- g) 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 0,5 M, 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;
- j) solução tampão Tris-EDTA –A (TE-A), pH 7,8 (MATTHEWS et al. 1997),
- 10 mM Tris base, Gibco BRL ;
- 5 mM EDTA, Pharmacia;
- k) solução tampão Tris-EDTA -B (TE-B), pH 7,8 (MATTHEWS et al. 1997),
- 50 mM Tris base, Gibco BRL;
- 20 mM 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, 20 mM;
- n) solução de ácido acético, 20 mM, Fatec;
- o) solução de acetato de sódio, 20 mM, Sigma;
- p) solução de dodecil sulfato de sódio (SDS), Pharmacia, 20 % (p/v) em TE-B;
- q) solução de lisostafina (100 µg.mL⁻¹) , Sigma, em tampão acetato 20mM;
- r) solução de cloreto de sódio 5 M, Fatec;
- s) fenol, Sigma;
- t) álcool etílico absoluto, Nuclear;
- u) solução de Proteinase K, Sigma, 20 mg.mL⁻¹;
- v) agarose ultrapura, Gibco BRL;
- x) padrões de peso molecular, 1 Kb Plus DNA Ladder e 100 bp DNA Ladder, Gibco BRL;

4.3.2 Equipamentos

- a) espectrofotômetro UV/visível, Ultrospec 2000, Pharmacia Biotech;
- b) aparelho termociclador para amplificação de DNA, Techne, Progene;
- c) cuba para eletroforese horizontal de géis de agarose, Pharmacia Biotech;
- d) fonte para eletroforese, modelo 250, Life Technologies, Gibco BRL;
- e) centrífuga para microtubos, Max. 14000 rpm, Jouan BR 4I;
- f) camera fotográfica digital, DC 40, Kodak Digital Science, Eastman Kodak Company;
- g) software Kodak Digital Science 1D (KDS 1D), V. 2.01, Eastman Kodak Company;
- h) software Vector NTI 4.0 for Windows, InforMax, Inc.;
- h) transluminador UV, TFX 35M, Life Technologies, Gibco BRL.

4.3.3 Extração de DNA

A extração de DNA genômico de todas as cepas identificadas como ECP foi realizada, com pequenas modificações, de acordo com o protocolo proposto por Matthews *et al.* (1997).

Primeiramente, transferiu-se uma alçada carregada com uma cultura proveniente de TSA, após incubação a 37°C por 24 horas, para 100 µL de tampão TE-A até turbidez 1,0 da escala de McFarland. A lise do peptidoglicano celular ocorria pela adição de 100 µL de lisostafina e incubação por 45 minutos a 37°C. Para completar a lise celular adicionava-se, em seqüência, 20 µL de tampão TE-B contendo 20 % de SDS e 3 µL de proteinase K e incubava-se por uma hora a 37°C. Adicionava-se, então, 200 µL de solução NaCl 5 M e agitava-se, manualmente, por 15 segundos. Separava-se o material intracelular através de centrifugação a 10.000 g por 15 minutos à 4°C e transferia-se o sobrenadante para um novo microtubo.

Adicionava-se, então, fenol-clorofórmio (1:1) seguido de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) para liberação e separação de proteínas, cuja etapa era completada através de centrifugação a 10.000 g por 15 minutos e transferência do sobrenadante para um novo microtubo. A precipitação do DNA foi realizada com 800 µL de álcool etílico absoluto gelado, e manutenção em -20°C por toda noite. Passado este período, foi realizada nova centrifugação a 10.000 g por 15 minutos a 4°C, mantendo-se o “pellet” formado. Para aumentar a pureza do material extraído lavava-se o “pellet” duas vezes com álcool etílico 70 % e colocava-se para secar em capela de fluxo laminar, a temperatura ambiente, durante 30 minutos. Após, ressuspendia-se o “pellet” com 30 µL de água ultrapura estéril. 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 PCR.

4.3.4 Quantificação do DNA

Para quantificação do DNA, realizou-se a leitura da densidade ótica (DO) através da absorbância em dois comprimentos de onda, 260 e 280 nm. 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). A correção da concentração foi realizada através de diluição com água destilada esterilizada.

4.3.5 Amplificação de seqüências do gene *coa*

Para amplificação de seqüências do gene da coagulase utilizou-se os *primers* COAG2 (5'ACCACAAGGTACTGAATCAACG3') e COAG3 (5'TGCTTTTCGATTGTTTCGATGC3'), descritos por Aarestrup *et al.* (1995).

4.3.5.1 Reação PCR

Adaptou-se a metodologia para PCR proposta, primeiramente, por Goh *et al.* (1992) e modificada por Aarestrup *et al.* (1995). A solução de reação foi preparada com 10 µL do DNA extraído (20 nM), 1 µM de cada *primer* (COAG2 e COAG3), 200 µM de cada desoxinucleotídio trifosfato (dNTP), 1U de Taq Polimerase, 2,0 mM de MgCl₂ e 4 µL do tampão 10 X para PCR, perfazendo um volume total de 40 µL. A mistura foi termociclada por 40 ciclos, onde cada ciclo consistia de 50 segundos a 95°C, para desnaturação do DNA, dois minutos a 55°C, para ligação dos *primers*, e quatro minutos a 72°C para síntese da cadeia complementar (extensão). Foi incluído um controle positivo, constituído de DNA cromossômico previamente extraído de uma cepa padrão de *S. aureus* (ATCC 10832), e um controle negativo constituído de água ultrapura estéril. Após a termociclagem os tubos foram mantidos a -20°C até a execução da eletroforese. Todas as amostras de DNA foram submetidas à reação PCR com os *primers* COAG2 e COAG3 no mínimo duas vezes.

4.3.6 Amplificação de seqüências do gene *nuc*

Para identificação e diferenciação molecular de *S. intermedius* e *S. hyicus*, foram desenhados *primers*, específicos para cada uma das espécies, baseados em seqüências completas do gene *nuc* obtidas no GenBank/NCBI (número de acesso L23973 para *S. hyicus* e X67678 para *S. intermedius*). As seqüências selecionadas foram alinhadas entre si e com o gene *nuc* de *S. aureus* (número de acesso NC_002745), utilizando o software Blast (GenBank/NCBI) para se verificar a existência de regiões homólogas e não homólogas entre os três genes. Os *primers* foram desenhados de forma a anelarem nas regiões não homólogas, para garantir especificidade e possibilitar amplificações espécie-específicas. Antes de serem sintetizados, os *primers* foram testados utilizando-se o software Vector NTI. Os *primers* utilizados na amplificação de seqüências dos genes *nuc* de *S. intermedius* e

S. hyicus, e *coa* de *S. aureus*, assim como sua seqüência de bases nitrogenadas e o tamanho de produto de PCR estimado, são expostos na Tab. 2.

Tabela 3 - Oligonucleotídios utilizados para identificação e diferenciação molecular entre *S. aureus*, *S. intermedius* e *S. hyicus*, produtos de PCR e espécies alvos.

<i>Primer</i>	Seqüência 5´- 3´	Produto de amplificação (pb) estimado	Espécie
NUC1	GCCCCTGCAATGAGAGG	334	<i>S. hyicus</i>
NUC2	CGGACCACTTTCCGTC		
NUC3	CGCCGTTCTCTCTTTGG	431	<i>S. intermedius</i>
NUC4	CGCCTCTCACATCCG		
COAG2	ACCACAAGGTACTGAATCAACG	variável ^a	<i>S. aureus</i>
COAG3	TGCTTTCGATTGTTTCGATGC		

^a Aarestrup *et al.* (1995) e Motta *et al.* (2001).

4.3.6.1 Reação PCR

A solução de reação foi preparada de maneira idêntica a utilizada para amplificação de seqüências do gene *coa*, utilizando 1 µM de cada *primer* (NUC1 e NUC2 para isolados de *S. hyicus* ou NUC 3 e NUC4 para *S. intermedius*). A mistura foi termociclada por 40 ciclos, onde cada ciclo consistia de 50 segundos a 95°C, dois minutos a 42°C e quatro minutos a 72°C (GOH *et al.*, 1992). Para a determinação da temperatura de anelamento foi utilizada, primeiramente, a equação 1, a qual é baseada na seqüência de bases nitrogenadas de cada *primer*.

$$[(A + T) \times 2] + [(C + G) \times 4] - 10 = Tm \quad \text{Equação 1}$$

Fonte :Invitrogen (2002)

Através da utilização da Equação 1, foram encontradas temperaturas de anelamento de 46°C e 42°C, para os *primers* NUC1 e NUC2, respectivamente. Já para os *primers* NUC3 e NUC4, encontrou-se 42°C e 40°C, respectivamente. Após a

realização de experimentos preliminares para otimização das condições de reação, onde foram testadas todas as temperaturas obtidas através da Equação 1, adotou-se a temperatura de 42°C como padrão para todos os *primers* NUC. Foram incluídos como controles positivos, DNA cromossômico previamente extraído de cepas de *S. hyicus* e de *S. intermedius* de origem clínica e um controle negativo, constituído de água ultrapura esterilizada. Após a termociclagem, os microtubos foram mantidos a -20°C até a execução da eletroforese. Todas as amostras de DNA foram submetidas à reação PCR com os *primers* NUC1 e NUC2 e com NUC3 e NUC4 no mínimo duas vezes

4.3.7 Visualização e análise dos produtos amplificados

Imediatamente antes da aplicação no gel, os produtos de PCR foram descongelados e foi retirada uma alíquota de 10 µL que foi adicionada a 2 µL 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 0,5 µg.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 (1 Kb Plus DNA Ladder ou 100 bp DNA Ladder). A visualização das bandas no gel e a fotodigitalização foram realizadas sob transiluminação com luz ultravioleta, sendo o tamanho dos fragmentos amplificados, determinado pelo software KDS 1D, através de comparação com os padrões de peso molecular.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Diferenciação Bioquímica entre *S. aureus*, *S. hyicus* e *S. intermedius*

5.1.1 Caracterização das cepas de estafilococos coagulase positiva

As 65 cepas foram submetidas aos testes de coloração diferencial de Gram e de produção das enzimas catalase, coagulase livre e termonuclease (TNase), cujos resultados estão expostos na Tab. 4.

Tabela 4 - Percentual de cepas com reação positiva nos testes de coloração diferencial de Gram, produção de catalase, produção de termonuclease e produção de coagulase livre

Número de cepas	Gram	Catalase	Termonuclease	Coagulase
65 ECP ^a	100	100	95,4	73,8 ^b /100 ^c

^aEstafilococos coagulase positiva;

^bPercentual de cepas com reação positiva no teste da coagulase livre, considerando como resultados positivos, apenas as reações com intensidades de 3+ e 4+;

^cPercentual de cepas com reação positiva no teste da coagulase livre, considerando como resultados positivos as reações com intensidades de 1+, 2+, 3+ e 4+;

Através dos resultados apresentados na Tab.3, verifica-se que todos as cepas foram Gram positivas e produziram catalase.

Verificou-se que três cepas apresentaram resultado negativo no teste da produção de termonuclease e resultado positivo no teste da coagulase livre. Apesar da produção de termonuclease ser considerada uma característica diferencial para ECP, sendo utilizada como teste complementar à coagulase livre (HUI et al., 1994), verifica-se que em diversos trabalhos encontrados na literatura consultada, freqüentemente, são isoladas cepas de ECP que não produzem esta enzima. Pode-se citar, por exemplo, os trabalhos de Adegoke & Ojo (1982) os quais, trabalhando com 82 cepas de *S. aureus* isoladas em caprinos, verificaram que 49 (63 %) não produziram termonuclease, e de Speers et al. (1998) que encontraram 9 (15 %) cepas de *S. aureus* não produziram termonuclease em culturas sangüíneas. O percentual de cepas de *S. aureus* termonuclease negativa relatado por esses autores é superior ao encontrado neste trabalho, entretanto, outros pesquisadores obtiveram resultados inferiores. Exemplos são as pesquisas desenvolvidas por Behme et al. (1996) que, trabalhando com 133 culturas de *S. aureus*, encontraram apenas 1 cepa termonuclease negativa, e por Silva et al. (2000) que verificaram que apenas 6 (2,4 %), entre 250 cepas de *S. aureus*, não produziram esta enzima.

Cepas de *S. hyicus* e de *S. intermedius* termonuclease negativa também já foram relatadas na literatura (ADESIYUN et al., 1984; BEHME et al., 1996).

A existência de cepas de ECP que não produzem TNase, associada ao fato de que outras espécies de estafilococos coagulase negativa têm capacidade de produzir esta enzima (BRAKSTAD & MAELAND, 1995), sugere uma certa limitação na utilização isolada deste teste para identificação e diferenciação entre ECP e as demais espécies estafilocócicas. Além disso, Faruki & Murray (1986) descrevem a termonuclease como uma enzima cuja produção é extremamente dependente do meio e sua expressão, dependente de estímulos externos.

Lancette & Tatini (1992) e ICMSF (1996) consideram que apenas os coágulos com intensidade 3+ e 4+ devem ser considerados como positivos no teste de produção de coagulase livre. Se levarmos em conta esta forma de interpretação

dos resultados, 17 das 65 cepas utilizadas neste estudo não seriam consideradas ECP, pois apresentaram reação com intensidade 2+. Entretanto, como estas cepas foram Gram positivas, produziram catalase e termonuclease, foram consideradas ECP e selecionadas para os estudos bioquímicos e moleculares posteriores.

Outro fato que levou à inclusão destas cepas é a falta de um consenso a respeito da correta interpretação do teste da coagulase (SILVA et al., 2000). Bennete & Lancette (1995) sugerem que somente reações com intensidade 4+ devem ser consideradas positivas; Lancette & Tatini (1992) e a ICMSF (1996) consideram coágulos com intensidade 3+ e 4+ como positivos e a AOAC (1990) E HARRIGAN (1998) preconizam que reações com intensidade variando desde 1+ até 4+ devem ser registradas como positivas. Silva et al. (2000) trabalhando com 274 cepas de *S. aureus* isoladas em leite mastítico, em mãos de ordenhadores e em ordenhadeiras mecânicas, demonstraram que utilizando o critério proposto por Lancette & Tatini (1992), corre-se o risco de obter falsos negativos, pois 15,3 % das cepas, identificadas como *S. aureus* através do kit API-Staph system (bioMérieux), apresentaram intensidade de reação 1+ e 2+ no teste da coagulase livre. A mesma constatação foi verificada no estudo desenvolvido por Boari et al. (2002) onde 34 de 38 cepas de ECP isoladas de queijos maturados apresentaram reação de intensidade 1+ ou 2+.

Os testes da coloração diferencial de Gram, de produção de catalase, de termonuclease e de coagulase livre, permitiram confirmar todas as cepas como ECP, além de verificar que as cepas não estavam contaminadas após sua manutenção em AC. Após, todas as 65 cepas foram submetidas aos testes de diferenciação bioquímica.

5.1.2 Diferenciação entre as três espécies de estafilococos coagulase positiva

Cinquenta e cinco (55) cepas que apresentaram crescimento em ABP e AP suplementados com acriflavina, que não produziram β -galactosidase e que não apresentaram atividade lipolítica em ágar polisorbato (Tween 80), foram identificadas, bioquimicamente, como *S. aureus*. Estas cepas apresentaram variabilidade nas respostas aos demais testes bioquímicos aplicados: 13 produziram pigmentos carotenóides, 36 fermentaram aerobicamente a maltose, 47 fermentaram anaerobicamente o manitol, 46 produziram acetoina e 40 apresentaram atividade hemolítica em ágar sangue (Tab. 5).

Seis (6) cepas foram identificadas como *S. hyicus*, por apresentarem resultado negativo em 8 dos nove testes bioquímicos realizados. Duas delas, entretanto, apresentaram atividade lipolítica em ágar polisorbato (Tween 80).

Foram identificadas como *S. intermedius*, 4 cepas que produziram β -galactosidase e que apresentaram resultados negativos nos testes da fermentação anaeróbica do manitol, do crescimento em ABP e ágar P suplementados com acriflavina, da produção de pigmentos e da atividade lipolítica em ágar polisorbato. Assim como *S. aureus*, as 4 cepas identificadas como *S. intermedius* apresentaram variabilidade em suas características bioquímicas: 1 fermentou a maltose, 1 apresentou atividade hemolítica em ágar sangue e 2 produziram acetoina.

Langlois et al. (1990) e Kloos & Bannermam (1999) sugerem que *S. aureus*, *S. hyicus* e *S. intermedius* diferem quanto ao tempo em que o coágulo apresentará sua máxima intensidade. Para verificação das afirmações destes autores foi construída a Tab.5.

Tabela 5 – Tempo de coagulação e intensidade máxima do coágulo, no teste da coagulase livre, em 65 cepas de *S. aureus*, *S. hyicus* e *S. intermedius*

Tempo (h)	<i>S. aureus</i> ^a (%)				<i>S. hyicus</i> ^a (%)				<i>S. intermedius</i> ^a (%)			
	2+	3+	4+	Total	2+	3+	4+	Total	2+	3+	4+	Total
1	3,6	-	27,3	30,9	-	16,7	16,7	33,4	-	-	50	50
2	1,8	5,4	14,5	21,8	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	5,4	-	5,4	-	-	16,7	16,7	-	-	-	-
4	1,8	-	1,8	3,6	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	1,8	-	1,8	16,7	-	-	16,7	-	-	-	-
6	-	1,8	-	1,8	16,7	-	-	16,7	-	-	-	-
7	-	-	1,8	1,8	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24	16,4	1,8	14,5	32,7	-	-	16,7	16,7	50	-	-	50
Total	23,6	16,4	60	100	33,4	16,7	50	100	50	-	50	100

^aEspécies microbianas identificadas nos estudos bioquímicos.

Neste trabalho, verificou-se que 61,7 % das cepas de *S. aureus* apresentaram intensidade de coagulação máxima em até 4 horas, o que vai ao encontro de Kloos & Bannermam (1999), que relatam que a maioria das cepas de *S. aureus* apresenta formação máxima de coágulo dentro deste mesmo período de tempo. De acordo com Langlois *et al.* (1990) 2 horas seriam suficiente para que a grande maioria das cepas de *S. aureus* apresentasse coágulos firmes, porém, neste trabalho, apenas 52,7 % das cepas desta espécie apresentaram coagulação máxima neste período.

Segundo Kloos & Bannermam (1999), cepas de *S. hyicus* e de *S. intermedius* que são coagulase positiva necessitam mais do que quatro horas para a formação máxima de coágulo, podendo requerer entre 12 e 24 horas. Já para Langlois *et al.* (1990), da mesma forma que *S. aureus*, a grande maioria das cepas destas duas espécies requereriam um período de 2 horas para a formação de coágulos firmes. Embora o número de cepas de *S. hyicus* e de *S. intermedius* estudadas neste trabalho seja pequeno, observou-se que metade das cepas de cada uma das espécies apresentou coagulação máxima dentro das primeiras 4 horas de incubação. Salienta-se que 33,4 % das cepas de *S. hyicus* e 50 % daquelas de *S. intermedius* apresentaram coagulação máxima nas duas primeiras horas.

A variabilidade nos resultados encontrados neste trabalho e a discordância com aqueles verificados por Langlois *et al.* (1990) e por Kloos & Bannermam (1999), sugerem que a avaliação do tempo necessário para coagulação máxima do plasma de coelho não é uma ferramenta adequada para a diferenciação entre as espécies de ECP, não sendo possível estabelecer um tempo padrão para cada espécie.

Avaliando-se os resultados, pode-se sugerir que o teste deve ser realizado por um período de 24 horas, como preconiza a ABNT (1991) e Lancette & Tatini (1992), realizando-se leituras em intervalos de tempo, pois deve-se levar em consideração que quando tempos de incubação prolongados são utilizados, há possibilidade de ocorrência de alguns problemas como, por exemplo, a quebra do coágulo pela ação da estafiloquinase (enzima que pode lisar o coágulo formado, originando resultados falsos negativos). A ocorrência de resultados falsos positivos ou falsos negativos no teste da coagulase pode, também, ser proveniente da utilização de plasma não estéril ou de inóculo impuro (KLOOS & BANNERMAM, 1999).

Os resultados dos testes bioquímicos utilizados para diferenciação entre as três espécies de estafilococos coagulase positiva, são apresentados na Tab. 6 e, a Tab. 7, apresenta o percentual de cepas de *S. aureus*, *S. intermedius* e *S. hyicus* com resultado positivo nos testes bioquímicos utilizados. Para a classificação de uma cepa como pertencente a uma das espécies em estudo, utilizaram-se os critérios descritos na Tab. 1.

Tabela 6 - Identificação em nível de espécie de 65 cepas de estafilococos coagulase positiva.

Número da cepa	Pig ^a	Hem ^b	β -gal ^c	Acet ^d	Mal ^e	Man ^f	Pol ^g	BPm ^h	Pm ⁱ	Espécie
1	-	-	-	+	+	+	-	+	+	<i>S. aureus</i>
2	-	-	-	+	-	+	-	+	+	<i>S. aureus</i>
3	+	-	-	-	+	+	-	+	+	<i>S. aureus</i>
4	-	-	-	-	+	+	-	+	+	<i>S. aureus</i>
5	+	+	-	+	-	+	-	+	+	<i>S. aureus</i>
6	+	+	-	+	-	-	-	+	+	<i>S. aureus</i>
7	+	+	-	+	-	+	-	+	+	<i>S. aureus</i>
8	+	+	-	+	+	+	-	+	+	<i>S. aureus</i>
9	-	+	+	-	+	-	-	-	-	<i>S. intermedius</i>
10	+	+	-	+	+	+	-	+	+	<i>S. aureus</i>
11	-	-	-	+	+	+	-	+	+	<i>S. aureus</i>
12	-	+	-	+	+	-	-	+	+	<i>S. aureus</i>
13	-	+	-	-	+	+	-	+	+	<i>S. aureus</i>
14	-	+	-	-	+	+	-	+	+	<i>S. aureus</i>
15	-	+	-	+	+	+	-	+	+	<i>S. aureus</i>
16	-	+	-	+	+	+	-	+	+	<i>S. aureus</i>
17	-	+	-	+	-	+	-	+	+	<i>S. aureus</i>

Tabela 6 -. Identificação em nível de espécie de 65 cepas de estafilococos coagulase positiva (continuação).

Número da cepa	Pig ^a	Hem ^b	β -gal ^c	Acet ^d	Mal ^e	Man ^f	Pol ^g	BPm ^h	Pm ⁱ	Espécie
18	-	+	-	+	+	+	-	+	+	<i>S. aureus</i>
19	-	+	-	+	+	+	-	+	+	<i>S. aureus</i>
20	-	+	-	+	+	+	-	+	+	<i>S. aureus</i>
21	+	+	-	+	+	+	-	+	+	<i>S. aureus</i>
22	-	+	-	+	+	+	-	+	+	<i>S. aureus</i>
23	-	+	-	+	+	+	-	+	+	<i>S. aureus</i>
24	+	+	-	+	-	+	-	+	+	<i>S. aureus</i>
25	-	-	+	-	-	-	-	-	-	<i>S. intermedius</i>
26	-	+	-	+	+	+	-	+	+	<i>S. aureus</i>
27	-	+	-	+	-	+	-	+	+	<i>S. aureus</i>
28	-	+	-	+	-	+	-	+	+	<i>S. aureus</i>
29	-	+	-	+	-	+	-	+	+	<i>S. aureus</i>
30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>S. hyicus</i>
31	-	+	-	+	+	+	-	+	+	<i>S. aureus</i>
32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>S. hyicus</i>
33	+	-	-	-	+	+	-	+	+	<i>S. aureus</i>
34	-	+	-	-	+	+	-	+	+	<i>S. aureus</i>

Tabela 6 - Identificação em nível de espécie de 65 cepas de estafilococos coagulase positiva (continuação).

Número da cepa	Pig ^a	Hem ^b	β -gal ^c	Acet ^d	Mal ^e	Man ^f	Pol ^g	BPm ^h	Pm ⁱ	Espécie
35	-	+	-	+	-	+	-	+	+	<i>S. aureus</i>
36	-	+	-	+	-	+	-	+	+	<i>S. aureus</i>
37	-	+	-	+	-	-	-	+	+	<i>S. aureus</i>
38	-	+	-	-	+	+	-	+	+	<i>S. aureus</i>
39	-	-	-	+	+	+	-	+	+	<i>S. aureus</i>
40	-	+	-	-	+	+	-	+	+	<i>S. aureus</i>
41	-	+	-	+	+	+	-	+	+	<i>S. aureus</i>
42	-	+	-	+	+	+	-	+	+	<i>S. aureus</i>
43	-	-	-	+	+	+	-	+	+	<i>S. aureus</i>
44	-	-	+	+	-	-	-	-	-	<i>S. intermedius</i>
45	-	+	-	+	+	+	-	+	+	<i>S. aureus</i>
46	-	-	-	+	+	-	-	+	+	<i>S. aureus</i>
47	+	+	-	+	-	+	-	+	+	<i>S. aureus</i>
48	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>S. hyicus</i>
49	-	+	-	-	-	+	-	+	+	<i>S. aureus</i>
50	-	+	-	+	-	+	-	+	+	<i>S. aureus</i>
51	-	+	-	+	-	+	-	+	+	<i>S. aureus</i>

Tabela 6 - Identificação em nível de espécie de 65 cepas de estafilococos coagulase positiva (continuação).

Número da cepa	Pig ^a	Hem ^b	β -gal ^c	Acet ^d	Mal ^e	Man ^f	Pol ^g	BPm ^h	Pm ⁱ	Espécie
52	-	+	-	+	+	+	-	+	+	<i>S. aureus</i>
53	+	+	-	+	+	+	-	+	+	<i>S. aureus</i>
54	-	-	-	+	+	+	-	+	+	<i>S. aureus</i>
55	-	+	-	+	-	+	-	+	+	<i>S. aureus</i>
56	-	-	-	+	-	-	-	+	+	<i>S. aureus</i>
57	-	-	-	+	-	+	-	+	+	<i>S. aureus</i>
58	+	+	-	+	+	-	-	+	+	<i>S. aureus</i>
59	-	-	-	+	+	-	-	+	+	<i>S. aureus</i>
60	-	-	-	+	+	-	-	+	+	<i>S. aureus</i>
61	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>S. hyicus</i>
62	-	-	-	-	-	-	+	-	-	<i>S. hyicus</i>
63	-	-	-	-	-	-	+	-	-	<i>S. hyicus</i>
64	+	-	-	+	+	+	-	+	+	<i>S. aureus</i>
65	-	-	+	+	-	-	-	-	-	<i>S. intermedius</i>

+ resultado positivo, - resultado negativo;

^aProdução de pigmentos carotenóides;

^bAtividade hemolítica em ágar sangue de carneiro 5%;

^cProdução de β -galactosidase;

^dProdução de acetoína;

^eFermentação aeróbica da maltose;

^fFermentação anaeróbica do manitol;

^gAtividade lipolítica em Polisorbato (tween 80);

^hCrescimento em ágar Baird-Parker modificado, suplementado com acriflavina ($7 \mu\text{g.mL}^{-1}$);

ⁱCrescimento em ágar P modificado, suplementado com acriflavina ($7 \mu\text{g.mL}^{-1}$).

Tabela 7- Percentual de cepas, por espécie de estafilococos coagulase positiva, com resultado positivo nos testes bioquímicos de identificação.

Espécie	Pig ^a	Hem ^b	β -gal ^c	Acet ^d	Mal ^e	Man ^f	Pol ^g	BPm ^h	Pm ⁱ
<i>S. aureus</i>	23,6	72,7	0,0	83,6	65,4	85,4	0,0	100	100
<i>S. intermedius</i>	0,0	25,0	100,0	50,0	25,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>S. hyicus</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	33,3	0,0	0,0

^aProdução de pigmentos carotenóides;

^bAtividade hemolítica em ágar sangue de carneiro 5%;

^cProdução de β -galactosidase;

^dProdução de acetoína;

^eFermentação aeróbica da maltose;

^fFermentação anaeróbica do manitol;

^gAtividade lipolítica em Polisorbato (tween 80);

^hCrescimento em ágar Baird-Parker modificado, suplementado com acriflavina ($7 \mu\text{g.mL}^{-1}$);

ⁱCrescimento em ágar P modificado, suplementado com acriflavina ($7 \mu\text{g.mL}^{-1}$).

O percentual de cepas identificadas como *S. aureus*, que produziram pigmentos carotenóides em BHA (Tab. 7), está abaixo daquele encontrado por Gill et al. (1994), os quais, trabalhando com 116 cepas de *S. aureus* isoladas em leite, produtos lácteos, carne bovina, produtos cárneos e em superfícies de equipamentos e das mãos de manipuladores de alimentos, encontraram que 87% das cepas produziam estes pigmentos. Segundo Kloos & Bannerman (1999), a maioria das cepas de *S. aureus* são pigmentadas e estes autores sugerem que o ideal, para detecção visual de pigmentos, é a incubação em temperatura ambiente, podendo-se aumentar a capacidade de produção pela adição de leite, gordura, glicerol ou sabão ao meio de cultura. Neste trabalho foram utilizadas as recomendações de Gill et al. (1994) que preconizam a utilização do meio BHA e leitura após cinco dias de incubação a 37°C e, o baixo percentual encontrado, pode ter sido influenciado por fatores como meio de cultura, temperatura e tempo de incubação.

Este teste é de fácil execução e leitura, entretanto, a variabilidade encontrada entre as cepas identificadas como *S. aureus* em produzirem pigmentos carotenóides, no meio testado, demonstra que não é aplicável para identificação desta espécie nem para sua diferenciação dos demais ECP. Com relação às outras duas espécies, apesar do número reduzido de cepas de *S. hyicus* e de *S. intermedius* utilizadas neste estudo, pode-se verificar que nenhuma cepa produziu pigmentos, possibilitando, desta maneira, que este teste possa ser aplicado de forma complementar a outros testes. Este resultado vem ao encontro do que é relatado pela literatura, onde *S. hyicus* e *S. intermedius* são consideradas espécies que não produzem pigmentos carotenóides (GILL et al., 1994; KLOOS & BANNERMAN, 1999).

A avaliação da capacidade de fermentação anaeróbica do manitol tem sido recomendada para diferenciar *S. aureus* de outras espécies coagulase positiva (KLOOS, 1990; ROBERSON, et al., 1992; CAPURRO et al., 1999; BRITO et al., 2002). Neste trabalho, 85,4 % das cepas de *S. aureus* foram capazes de fermentar

anaerobicamente o manitol, enquanto que nenhuma cepa de *S. hyicus*, nem de *S. intermedius*, fermentou este carboidrato. Resultado semelhante foi encontrado por Brito *et al.* (2002), os quais, trabalhando com 49 ECP isolados em vacas acometidas de mastite subclínica (38 identificados como *S. aureus*), verificaram que 89,5 % das cepas de *S. aureus* eram capazes de fermentar este carboidrato sob condições de anaerobiose. Já Roberson *et al.* (1992) trabalhando com 80 cepas de cada uma destas três espécies de estilococos, provenientes de diferentes origens e Capurro *et al.* (1999), utilizando 414 cepas de ECP isoladas em leite proveniente de vacas com mastite subclínica, encontraram percentuais mais elevados de cepas de *S. aureus* com esta característica: 99 % e 100 %, respectivamente. Nesses três trabalhos citados acima, nenhuma cepa de *S. hyicus*, nem de *S. intermedius*, apresentou capacidade de fermentar o manitol sob anaerobiose, indo ao encontro dos resultados deste estudo.

Segundo Roberson *et al.* (1992), este teste é trabalhoso e requer um período maior de execução que outros testes utilizados para a identificação e diferenciação entre ECP, podendo, além disso, ocorrer reações fracas que originam resultados falso-negativos. Estes fatos, associados aos 14,6 % de *S. aureus* que não fermentaram manitol, encontrados neste trabalho, sugerem não ser adequada a utilização isolada deste teste para diferenciar *S. aureus* de *S. hyicus* e de *S. intermedius*.

Observou-se que 65 % das cepas de *S. aureus* e 25 % das de *S. intermedius* fermentaram aerobicamente a maltose e que nenhuma cepa de *S. hyicus* foi capaz de fermentar esse carboidrato. Langlois *et al.* (1990), trabalhando com 83 cepas de *S. aureus* isoladas em bovinos, encontraram que 98,9 % foram capazes de utilizar este carboidrato, enquanto que Lange *et al.* (1999) verificaram que todas as 66 cepas de *S. aureus*, também isoladas em bovinos, foram capazes de fermentar a maltose. O percentual de *S. aureus* com resultado positivo no teste da maltose verificado nesses dois trabalhos, foi superior ao encontrado neste estudo.

O baixo percentual de cepas de *S. intermedius* que utilizaram a maltose, encontrado neste estudo, pode ser explicado pela baixa capacidade fermentativa desta espécie frente a este carboidrato, conforme relatado por Varnam & Evans (1991), Roberson et al. (1996) e Jablonski & Bohach (1997). Com relação a *S. hyicus*, observou-se que nenhuma cepa fermentou a maltose, o que vai ao encontro do que relatam Varnam & Evans (1991) e Jablonski & Bohach (1997), que descrevem esta espécie como não fermentadora deste carboidrato. Em contrapartida, Langlois et al. (1990) verificaram que 14,3 %, de 42 cepas identificadas como *S. hyicus*, foram capazes de produzir ácido a partir da maltose.

O teste de fermentação da maltose foi incluído como uma forma de diferenciar *S. aureus* e *S. intermedius* de *S. hyicus*. Entretanto, devido à variabilidade verificada, pode-se inferir que é uma ferramenta que analisada de forma única, não tem precisão suficiente para permitir a identificação e diferenciação dos ECP em questão, devendo ficar condicionada a utilização simultânea com outros testes. Entretanto, Kloos & Jorgensen (1985) ressaltam a importância de testes como o da fermentação aeróbia da maltose, salientando que os testes com carboidratos, quando não utilizados de forma isolada e, sim, em conjunto, aumentam significativamente a precisão na identificação de microrganismos.

Através da análise da atividade hemolítica em ágar sangue de carneiro, verificou-se que 72,7 % de *S. aureus* e 25 % de *S. intermedius* apresentaram reações positivas, não sendo verificada atividade hemolítica para *S. hyicus*. Roberson et al. (1996) descrevem que *S. aureus* e *S. intermedius* são capazes de produzir hemólise em ágar sangue, salientando, entretanto, que se pode encontrar cepas não hemolíticas em ambas espécies. Kloos & Jorgensen (1985) descrevem que a maioria das cepas de *S. aureus* apresenta atividade hemolítica, que *S. intermedius* apresenta atividade hemolítica variável e que a maioria das cepas de *S. hyicus* não produzem hemólise em ágar sangue. Corroborando estas informações, pode-se citar os estudos de Gill et al.

(1994), que encontraram 77 (63,4 %) cepas de *S. aureus* hemolíticas entre 116 analisadas e de Kibenge et al. (1983) que verificaram a inexistência de atividade hemolítica em 13 cepas de *S. hyicus* isoladas em frangos, demonstrando a coerência dos resultados encontrados neste estudo.

A atividade hemolítica, assim como a fermentação da maltose, têm sido utilizadas para diferenciar *S. aureus* e *S. intermedius* (hemolíticos) de *S. hyicus* (não-hemolíticos), mas, novamente devido à variabilidade verificada entre as cepas de cada espécie, pode-se inferir que sua utilização para diferenciação entre estas espécies deve ser condicionada a utilização simultânea com outros testes.

A atividade lipolítica em Polisorbato (Tween 80) foi sugerida por Oliveira (2000) como o melhor teste para diferenciar *S. hyicus* (lipolítico em Tween 80) de *S. aureus* (não lipolítico neste meio). Neste trabalho, nenhum estafilococo identificado como *S. aureus* ou como *S. intermedius*, apresentou reação positiva neste teste. Entretanto, com relação a *S. hyicus*, apenas 2 cepas (33,3 %) apresentaram atividade lipolítica. Resultados semelhantes foram relatados por Kinbege et al. (1983) que encontraram 6 cepas (46,1 %) não lipolíticas em ágar polisorbato, de um total de 13 cepas de *S. hyicus* isoladas em frangos.

Kloos & Bannerman (1999) consideram de grande utilidade o teste da produção de acetoína (teste de Voges-Proskauer) para diferenciar *S. aureus* (positivo) de *S. intermedius* e *S. hyicus* (negativos). Neste trabalho, entre as 55 cepas de *S. aureus*, 46 (83,6 %) produziram acetoína. Da mesma maneira, 2 (50 %) de *S. intermedius* também apresentaram resultado positivo. Nenhuma cepa de *S. hyicus* produziu este composto. Brito et al. (2002) encontraram resultado semelhante em relação ao percentual de *S. aureus*, onde 81,6 %, de um total de 38 cepas, produziram acetoína, entretanto,

Roberson et al. (1992) e Capurro et al. (1999), observaram percentuais mais elevados, com 94 % e 98 %, respectivamente.

Duas cepas (50 %) de *S. intermedius* foram produtoras de acetoína, o que também foi observado por Capurro et al. (1999), que encontraram 2 cepas (25 %) de *S. intermedius* com resultado positivo neste teste. Estes resultados estão em desacordo com Kloos & Bannerman (1999), que consideram *S. intermedius* como não produtor de acetoína. Entretanto, Varnam & Evans (1991) e Jablonski & Bohach (1997) descrevem que esta espécie é capaz de produzir este composto. Com relação a *S. hyicus*, os resultados encontrados estão de acordo com todos os trabalhos citados na literatura consultada, que descrevem que esta espécie não produz acetoína (ROBERSON et al., 1992; CAPURRO et al., 1999; KLOOS & BANNERMAN, 1999; BRITO et al., 2002).

O teste de produção de β -galactosidase (teste ONPG) apresentou elevado poder discriminatório, tendo em vista que 100 % das cepas de *S. aureus* e de *S. hyicus*, apresentaram resultado negativo e que 100 % das cepas de *S. intermedius* produziram esta enzima, o que também foi observado por Roberson et al. (1992) e Capurro et al. (1999).

Estes resultados demonstram a grande utilidade deste teste para diferenciar *S. intermedius* das outras duas espécies coagulase positiva. Além disso, β -galactosidase foi, dentre os testes utilizados, o que permitiu a obtenção dos resultados em menor tempo, demandando um período de incubação de apenas 1 hora. As desvantagens deste teste estão relacionadas com o custo elevado do substrato ONPG e com a possibilidade de falsos positivos, quando se trabalha com colônias de *S. aureus* com forte pigmentação amarela, já que a avaliação da positividade do teste se dá pela mudança de coloração do meio, de incolor para amarelo. Uma alternativa para evitar falsos positivos foi proposta por Kloos & Bannerman (1999) que sugeriram a adição do

corante Fast blue BB, em solução de 2-metoxietanol, ao caldo ONPG, no qual a reação positiva é demonstrada pelo aparecimento de coloração púrpura.

A resistência a acriflavina foi utilizada em diversos estudos para diferenciar *S. aureus* de *S. intermedius* e de *S. hyicus* (DEVRIESE, 1981; HARMON *et al.*, 1991; ROBERSON *et al.*, 1992; CAPURRO *et al.*, 1999; BRITO *et al.*, 2002). Harmon *et al.* (1991) verificaram que 155 (99,3 %) de 156 *S. aureus* isolados em leite bovino cresceram em ágar P suplementado com 7 µg de acriflavina por mililitro, enquanto apenas 1 (10 %), entre 10 *S. intermedius* isolados em cães, se desenvolveu, apresentando, entretanto, fraco crescimento. Roberson *et al.* (1992), Capurro *et al.* (1999) e Brito *et al.* (2002) verificaram que 100 % das cepas de *S. aureus* cresceram em ágar P e ABP suplementados com acriflavina (7 µg.mL⁻¹) e que nenhuma cultura de *S. intermedius* ou de *S. hyicus* foi capaz de crescer nestes meios. Em concordância com esses resultados, neste estudo, todas as 55 cepas de *S. aureus* (100 %) cresceram em ágar P e ABP suplementados com acriflavina (7 µg.mL⁻¹), assim como nenhuma cepa de *S. intermedius*, nem de *S. hyicus*, apresentou crescimento nestes meios.

Comparando-se os meios utilizados no teste de resistência à acriflavina, verificou-se que ambos apresentaram a mesma capacidade discriminatória, entretanto, o menor tempo de incubação demandado pelo ágar P, o qual possibilita a obtenção de resultados em 24 horas, enquanto o ABP pode necessitar de 48 horas, bem como o custo mais elevado do ABP, representam vantagens para este último.

Avaliando-se os resultados dos testes bioquímicos, foi construída a árvore decisória, apresentada na Fig.1, embora neste estudo todas as cepas tenham sido submetidas a todos os testes bioquímicos.

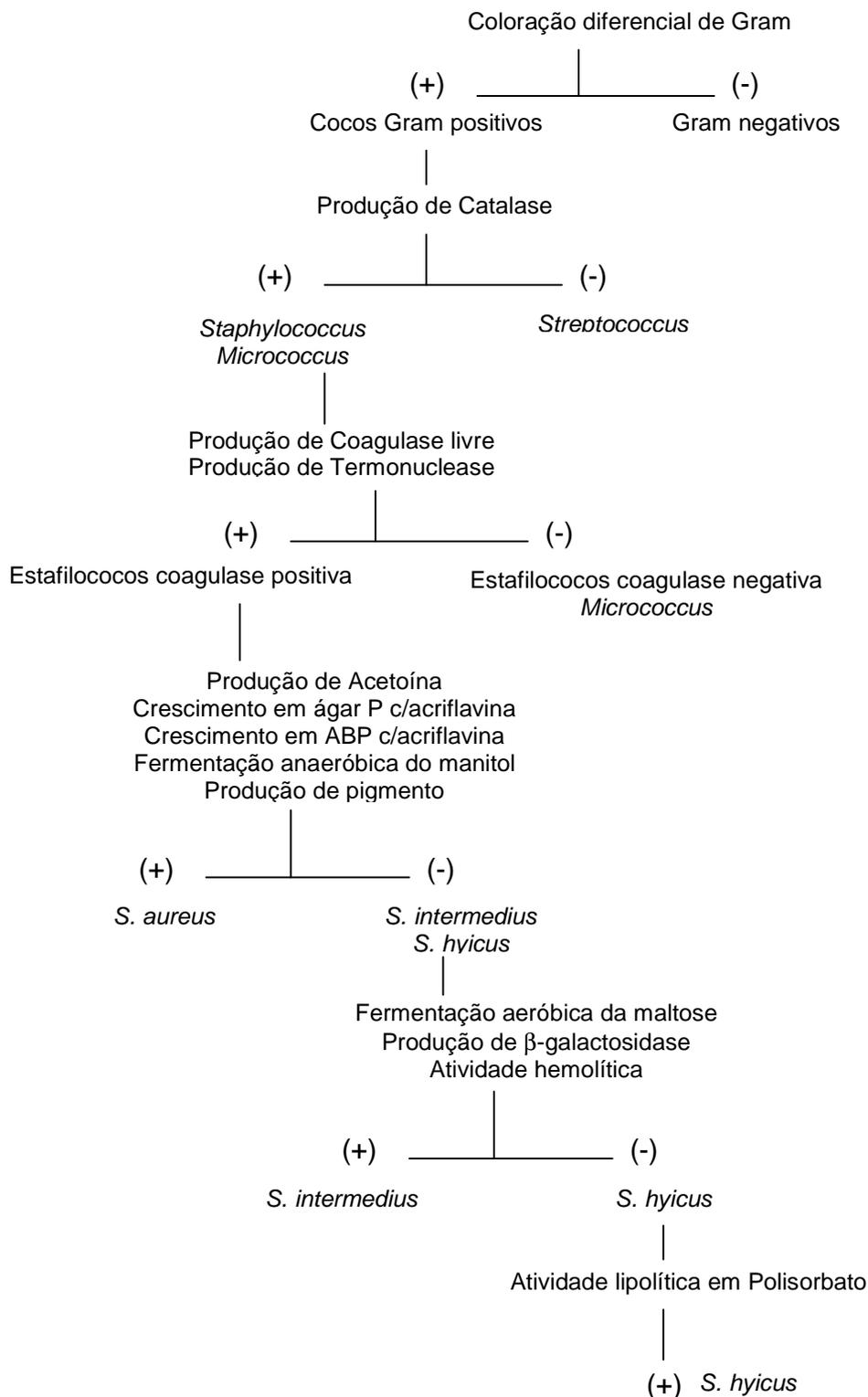


Figura 1 - Árvore decisória para identificação e diferenciação bioquímica entre *S. aureus*, *S. intermedius* e *S. hyicus*.

Fonte: Adaptado e modificado de Capurro *et al.* (1999).

Neste estudo verificou-se que os testes de resistência a acriflavina e de produção de β -galactosidase demonstraram maior capacidade discriminatória em relação aos demais testes bioquímicos. Pois não houve variabilidade de resultados entre as cepas de cada espécie nestes dois testes, permitindo desta forma que as espécies *S. aureus*, *S. hyicus* e *S. intermedius* fossem identificadas com maior exatidão. Os resultados sugerem que a utilização conjunta destes dois testes permite a diferenciação entre estas três espécies de ECP, o que vai ao encontro de Roberson *et al.* (1992) e Capurro *et al.* (1999), que também relatam que estes testes são os mais precisos para a diferenciação destas três espécies microbianas. Os testes de fermentação anaeróbica do manitol e de produção de acetoina também apresentaram poder discriminatório satisfatório para *S. aureus* (acima de 80 %), entretanto, devido à variabilidade verificada entre as cepas, não é recomendada a sua utilização de forma isolada, podendo, entretanto, serem utilizados em associação aos testes da resistência a acriflavina e da produção de β -galactosidase, aumentando a probabilidade de discriminação entre as espécies. Os demais testes podem ser utilizados, mas sempre de maneira complementar e associados a outros, pois apresentaram baixo poder discriminatório.

A partir dos resultados obtidos pode-se sugerir que, para identificação e diferenciação bioquímica entre as espécies *S. aureus*, *S. intermedius* e *S. hyicus*, sejam utilizados os testes de resistência a acriflavina e de produção de β -galactosidase, após a prévia obtenção de resultados positivos nos testes da coloração diferencial de Gram, catalase, coagulase livre e/ou termonuclease. Os demais testes utilizados neste estudo poderiam ser utilizados de forma complementar, para aumentar a probabilidade de discriminação.

5.2 Diferenciação Molecular entre Estafilococos Coagulase Positiva

Os *primers* COAG2 e COAG3 foram utilizados em todos os 65 ECP, tendo ocorrido ampliações em 55 cepas, as quais não amplificaram com os dois outros conjuntos de *primers* utilizados. Das demais cepas, 6 produziram ampliações com os *primers* NUC1 e NUC2 e 4 com NUC3 e NUC4. As cepas que produziram ampliações com os *primers* NUC1 e NUC2 não amplificaram com os *primers* NUC3 e NUC4, sendo a recíproca verdadeira.

5.2.1 Amplificação de seqüências do gene *coa*

Através dos resultados obtidos, verificou-se que os *primers* COAG2 e COAG3 demonstraram especificidade para *S. aureus*, pois se obteve ampliações em todas as reações em que o DNA de cepas desta espécie foi utilizado. Além disso, não houve amplificação quando o DNA de cepas das outras duas espécies foi utilizado. Este resultado está de acordo com o que foi descrito por Aarestrup *et al.* (1995) e por Motta *et al.* (2001), que usaram *primers* com a mesma seqüência dos utilizados neste trabalho, para amplificar o gene *coa*, e também verificaram a especificidade destes oligonucleotídeos para *S. aureus*. Aarestrup *et al.* (1995) estudaram a amplificação de seqüências do gene *coa* em 187 cepas de *S. aureus*, em 10 de *S. intermedius*, em 3 cepas de *S. hyicus*, em 1 cepa de *S. delphini* e em 1 cepa de *S. schleiferi* subespécie *coagulans*, e verificaram presença de bandas, apenas, em *S. aureus*. Motta *et al.* (2001) utilizaram 128 cepas de *S. aureus* e cepas de *S. schleiferi* e também verificaram ampliações apenas na primeira espécie. O tamanho do(s) fragmento(s) amplificado(s) e a ocorrência ou não de amplificação, para cada espécie analisada, estão apresentados na Tab. 8.

Tabela 8 - Diferenciação e identificação em nível de espécie entre 65 *Estafilococos* coagulase positiva, através da amplificação por PCR de seqüências específicas dos genes *coa* e *nuc*.

NC ^a	Amplificação			Fragmento(s) amplificado(s) (pb)	Espécie
	OLIG ^b COAG 2-3	NUC 1-2	NUC 3-4		
1	+ ¹	- ²	-	1148	<i>S. aureus</i>
2	+	-	-	1148	<i>S. aureus</i>
3	+	-	-	711	<i>S. aureus</i>
4	+	-	-	721	<i>S. aureus</i>
5	+	-	-	763	<i>S. aureus</i>
6	+	-	-	893	<i>S. aureus</i>
7	+	-	-	800	<i>S. aureus</i>
8	+	-	-	1332-1148-1007-711	<i>S. aureus</i>
9	-	-	+	1570-1160-1075- 912-740-667-583- 493-431-389-327- 269	<i>S. intermedius</i>
10	+	-	-	822-711-642	<i>S. aureus</i>
11	+	-	-	1332-693	<i>S. aureus</i>
12	+	-	-	642	<i>S. aureus</i>
13	+	-	-	1332-693-587	<i>S. aureus</i>
14	+	-	-	1007	<i>S. aureus</i>
15	+	-	-	908	<i>S. aureus</i>
16	+	-	-	893	<i>S. aureus</i>
17	+	-	-	861	<i>S. aureus</i>
18	+	-	-	874	<i>S. aureus</i>
19	+	-	-	874	<i>S. aureus</i>
20	+	-	-	602-417	<i>S. aureus</i>
21	+	-	-	655	<i>S. aureus</i>
22	+	-	-	734	<i>S. aureus</i>
23	+	-	-	874	<i>S. aureus</i>
24	+	-	-	626	<i>S. aureus</i>
25	-	-	+	1570-1306-1160- 740-667-550-431- 389-312-221-156	<i>S. intermedius</i>
26	+	-	-	861	<i>S. aureus</i>
27	+	-	-	734	<i>S. aureus</i>
28	+	-	-	780	<i>S. aureus</i>
29	+	-	-	763	<i>S. aureus</i>
30	-	+	-	368	<i>S. hyicus</i>
31	+	-	-	780	<i>S. aureus</i>
32	-	+	-	368	<i>S. hyicus</i>
33	+	-	-	861	<i>S. aureus</i>
34	+	-	-	822	<i>S. aureus</i>

Tabela 8 - Diferenciação e identificação em nível de espécie entre 65 *Estafilococos* coagulase positiva, através da amplificação por PCR de seqüências específicas dos genes *coa* e *nuc* (continuação).

NC ^a	Amplificação			Fragmento(s) amplificado(s) (pb)	Espécie
	OLIG ^b COAG 2-3	NUC 1-2	NUC 3-4		
35	+	-	-	861	<i>S. aureus</i>
36	+	-	-	822	<i>S. aureus</i>
37	+	-	-	674	<i>S. aureus</i>
38	+	-	-	908	<i>S. aureus</i>
39	+	-	-	922	<i>S. aureus</i>
40	+	-	-	665	<i>S. aureus</i>
41	+	-	-	763	<i>S. aureus</i>
42	+	-	-	554	<i>S. aureus</i>
43	+	-	-	780	<i>S. aureus</i>
44	-	-	+	1570-1160-1075- 697-603-511-431- 384	<i>S. intermedius</i>
45	+	-	-	800	<i>S. aureus</i>
46	+	-	-	642	<i>S. aureus</i>
47	+	-	-	554	<i>S. aureus</i>
48	-	+	-	368	<i>S. hyicus</i>
49	+	-	-	602	<i>S. aureus</i>
50	+	-	-	642	<i>S. aureus</i>
51	+	-	-	655	<i>S. aureus</i>
52	+	-	-	602	<i>S. aureus</i>
53	+	-	-	461	<i>S. aureus</i>
54	+	-	-	893	<i>S. aureus</i>
55	+	-	-	763	<i>S. aureus</i>
56	+	-	-	642	<i>S. aureus</i>
57	+	-	-	922	<i>S. aureus</i>
58	+	-	-	800	<i>S. aureus</i>
59	+	-	-	822	<i>S. aureus</i>
60	+	-	-	780	<i>S. aureus</i>
61	-	+	-	368	<i>S. hyicus</i>
62	-	+	-	368	<i>S. hyicus</i>
63	-	+	-	368	<i>S. hyicus</i>
64	+	-	-	763	<i>S. aureus</i>
65	-	-	+	1786-1505-1306- 957-841-697-583- 431-368-293	<i>S. intermedius</i>

^aNúmero da cepa; ¹ Amplificação (PCR positiva); ² Ausência de amplificação (PCR negativa)

^bOligonucleotídios (*primers*)

Analisando-se a Tab. 8 verifica-se uma elevada variabilidade no tamanho de fragmentos amplificados com os *primers* COAG2 e COAG3. Através de análise computacional (software KDS 1D) das fotos dos géis de agarose, foi possível identificar 26 bandas de tamanhos diferentes, conforme é mostrado nos exemplos de produtos amplificados apresentados nas Figuras 2 e 3 (os produtos de PCR das demais cepas de *S. aureus* são expostos no Apêndice A). Esta variabilidade pode ser decorrência da existência de diferentes formas gênicas estruturais da enzima coagulase em *S. aureus*, podendo, uma cepa, produzir uma ou mais destas variantes enzimáticas (HENDERSON & BRODIE, 1963; REEVES *et al.*, 1981; JELJASZEWICZ *et al.*, 1983; IANDOLO, 1990; GOH *et al.*, 1992). Em concordância com os resultados deste estudo, Motta *et al.* (2001) relatam que, apesar das diferenças de protocolos experimentais, em diversos estudos ficou demonstrada a existência de um grande polimorfismo associado ao gene da coagulase de *S. aureus*, entretanto, a razão para este polimorfismo ainda não está clara. Goh *et al.* (1992) sugeriram que o gene *coa* de *S. aureus* está envolvido em algum fator de virulência importante para essa espécie, sem, no entanto, aprofundarem esta discussão.

Devido ao grande número de fragmentos obtidos em pesquisas, com a amplificação do gene *coa*, alguns autores utilizaram como critério o agrupamento de fragmentos em classes ou faixas, para facilitar a análise dos resultados. Goh *et al.* (1992) e Schwarszkopf *et al.* (1992) obtiveram 10 e 3 classes de tamanhos diferentes de produtos de PCR, respectivamente, em cepas de *S. aureus* isoladas em humanos. Motta *et al.* (2001), trabalhando com cepas de *S. aureus* isoladas em bovinos, encontraram quatro classes de fragmentos amplificados. Goh *et al.* (1992) relataram a prevalência de fragmentos amplificados na faixa entre 355 e 610 pb, que foram observados em 30 % das cepas de *S. aureus*, enquanto Motta *et al.* (2001) verificaram que 42% das cepas deste microrganismo apresentaram fragmentos amplificados com, aproximadamente, 964 pb. Neste estudo, verificou-se que 85,5 % das 55 cepas de *S. aureus* apresentaram bandas na faixa entre 602 e 893 pb.

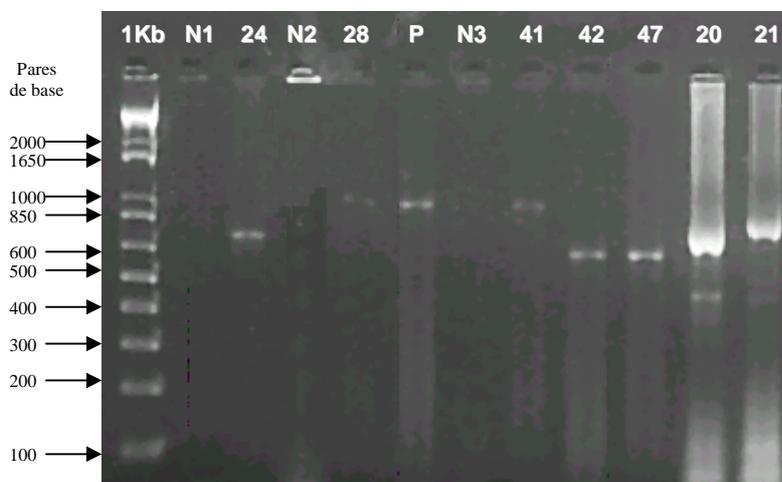


Figura 2- Produtos de PCR obtidos com os *primers* COAG2 e COAG3, visualizados em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio, sob luz ultravioleta. 1Kb-padrão de peso molecular (1 Kb Plus DNA Ladder), N1-controle negativo 1 (água destilada esterilizada), N2-controle negativo 2 (cepa de *S. intermedius* de origem clínica), N3-controle negativo 3 (cepa de *S. hyicus* de origem clínica), P-controle positivo (cepa ATCC 10832, *S. aureus*). 20, 21, 24, 28, 41, 42, e 47 são exemplos de produtos PCR obtidos com as culturas de *S. aureus*.

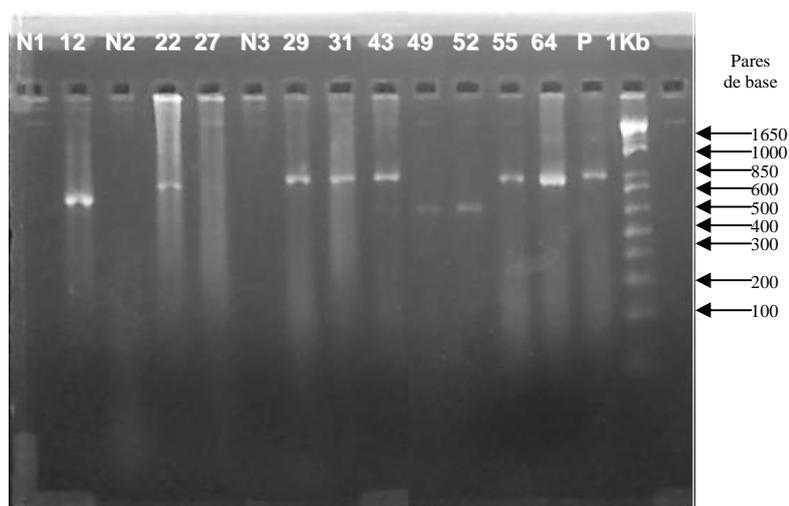


Figura 3- Produtos de PCR obtidos com os *primers* COAG2 e COAG3, visualizados em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio, sob luz ultravioleta. 1Kb-padrão de peso molecular (1 Kb Plus DNA Ladder), N1-controle negativo 1 (água destilada esterilizada), N2-controle negativo 2 (isolado de *S. intermedius* de origem clínica), N3-controle negativo 3 (isolado de *S. hyicus* de origem clínica), P-controle positivo (cepa ATCC 10832, *S. aureus*). 12, 22, 27, 29, 31, 43, 49, 52, 55 e 64 são exemplos de produtos PCR obtidos com as culturas de *S. aureus*.

Através da comparação dos resultados deste trabalho com os de Goh *et al.* (1992) e de Motta *et al.* (2001), verifica-se que não existe concordância em relação a uma faixa "padrão" de tamanhos de fragmentos amplificados.

A utilidade da amplificação do gene *coa* foi demonstrada em diversos estudos de tipificação, onde, na maioria dos casos, foi utilizada a associação entre a amplificação do gene *coa* e a ação da enzima de restrição *AluI*, obtendo-se resultados satisfatórios para a tipificação de cepas de *S. aureus* enterotoxigênicas (SCHWARZKOPF & KARCH, 1994; AARESTRUP *et al.*, 1995; HOOKEY *et al.*, 1998; CHIOU *et al.*, 2000; SHIMIZU *et al.*, 2000). Shimizu *et al.* (2000) sugeriram que a amplificação do gene *coa*, associada a ação da *AluI* e a análise por PFGE, são extremamente úteis em estudos epidemiológicos e na determinação de diferenças intra-específicas.

Diversos trabalhos, encontrados na literatura consultada, foram desenvolvidos visando identificar e diferenciar *S. aureus* através de métodos moleculares. Tamarapu *et al.* (2001) identificaram e diferenciaram *S. aureus* de *S. epidermidis* e de outras espécies não estafilocócicas, utilizando a amplificação dos genes *nuc* e *entC* (que expressa a EEC). Martineau *et al.* (2001) desenvolveram uma PCR baseada na amplificação do gene *tuf*, que codifica o fator de alongamento TU (*elongation factor Tu*, EF-Tu), que é o promotor na formação das cadeias peptídicas, para identificar *S. aureus* e diferenciá-lo de outras espécies estafilocócicas, como *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis* e *S. saprophyticus*. Barski *et al.* (1996) identificaram cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina através da amplificação, por PCR, de seqüências dos genes *mecA* (que determina a resistência a antibióticos β -lactâmicos) e *nuc*, onde a identificação foi demonstrada através da presença de fragmentos específicos em todas as cepas de *S. aureus* utilizadas no estudo. Também foram encontrados trabalhos de identificação de *S. aureus* utilizando um único *primer*. Bahrmand *et al.* (1996), por exemplo, desenvolveram uma PCR que utiliza um único oligonucleotídeo, denominando

a técnica de PCR com *primer* universal (*Universal Primer* PCR, UP-PCR), na qual *S. aureus* foi diferenciado de outras espécies não estafilocócicas pelo tamanho de fragmento amplificado. Matthews *et al.* (1997), da mesma forma, descreveram uma análise baseada em PCR que utiliza o *primer* OPA-7 (Operon Inc.), para identificar e diferenciar entre *S. aureus* coagulase positiva e coagulase negativa, com a diferenciação sendo baseada no tamanho de fragmento amplificado. Em nenhum dos trabalhos acima citados, assim como na maioria dos trabalhos encontrados na literatura consultada, foram incluídas cepas de *S. hyicus* e de *S. intermedius*, impossibilitando uma avaliação destes métodos para diferenciação entre ECP.

A especificidade dos *primers* COAG2 e COAG3 para *S. aureus* indica que, provavelmente, a seqüência alvo para estes oligonucleotídios no gene *coa* difere, significativamente, entre as espécies de ECP, o que potencializa a utilização deste gene para estudos de diferenciação entre *S. aureus*, *S. hyicus* e *S. intermedius*, indo ao encontro dos objetivos deste estudo. Entretanto, para garantir que somente a espécie *S. aureus* possui regiões alvo para estes dois *primers*, outras espécies de microrganismos deveriam ser testadas, inclusive espécies não estafilocócicas. Mesmo assim, baseado nos resultados encontrados, pode-se sugerir a amplificação por PCR do gene *coa*, utilizando COAG2 e COAG3, para diferenciar *S. aureus* de *S. intermedius* e de *S. hyicus*, onde a diferenciação dar-se-á pela presença ou ausência de fragmentos amplificados e não pelo tamanho das bandas obtidas.

5.2.2 Amplificação de seqüências do gene *nuc*

Para *S. hyicus*, através da análise prévia com software Vector NTI, foi estimada a amplificação de um fragmento com 334 pb, entretanto, obteve-se 368 pb para todas as cepas desta espécie, como pode ser verificado na Tab. 8 e na Figura 4. Esta diferença pode estar associada à origem das cepas, pois Goh *et al.* (1997), utilizando

sondas sintetizadas a partir de seqüências específicas do gene da proteína Chaperonin 60 (*Cpn60*), para diferenciar entre diversas espécies de *Staphylococcus*, verificaram que cepas de *S. hyicus* isoladas em suínos apresentaram hibridização, enquanto cepas isoladas em bovinos, não hibridizaram, sugerindo a existência de diferenças genéticas associadas a origem das cepas. Neste estudo a estimativa do tamanho de bandas, assim como o desenho dos *primers*, foi baseada em uma seqüência completa do gene *nuc* disponível no GenBank/NCBI (número de acesso L23973), não levando-se em consideração a origem da cepa na qual foi identificada esta seqüência, sendo possível que nas cepas em estudo, a seqüência alvo para os *primers* NUC1 e NUC2 apresente polimorfismo em relação a seqüência utilizada para a síntese dos oligonucleotídios, originando fragmentos amplificados de tamanhos diferentes, que podem ser decorrentes de mutações e/ou da variabilidade genética natural. Apesar desta diferença no tamanho do produto de PCR, observou-se que o conjunto de *primers* demonstrou ser específico para *S. hyicus*, pois somente quando o DNA desta espécie microbiana foi utilizado, houve amplificação.

Forsman *et al.* (1997) desenharam *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 (1997) desenvolveram uma 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, baseando sua análise na ocorrência de fragmentos amplificados que foram classificados como primários e secundários. Estes trabalhos diferem deste estudo porque utilizam, para identificação e diferenciação, diferenças no tamanho de fragmentos amplificados, enquanto neste, a diferenciação foi baseada na ocorrência de amplificação. Ao contrário do que foi verificado com os *primers* COAG2 e COAG3 para *S. aureus*, onde não foi possível definir uma faixa ou um tamanho de fragmento "padrão", neste caso, pode-se aceitar os valores 334 pb e 368 pb como tamanhos de fragmentos esperados na amplificação de DNA de *S. hyicus* com os *primers* NUC1 e NUC2.

A reação PCR com os *primers* NUC1 e NUC2, possibilitou a diferenciação entre *S. hyicus* e as outras duas espécies de ECP, entretanto, este resultado é baseado na amplificação do DNA de seis cepas de *S. hyicus*. Para um estudo mais efetivo é necessário que um número maior de cepas de *S. hyicus* e de outras espécies sejam testadas. Mesmo assim, baseado na especificidade verificada, pode-se inferir que estes *primers* têm potencial para serem utilizados na diferenciação entre esta espécie e *S. aureus* e *S. intermedius*.

Verificou-se uma grande variabilidade no tamanho de fragmentos amplificados obtidos com os *primers* NUC3 e NUC4. Assim como no caso de *S. hyicus*, para *S. intermedius* estimou-se, através de análise computacional, uma banda de 431pb, entretanto, foram obtidas 26 bandas de tamanhos diferentes (Tab. 8, Fig. 4). Ressalta-se, entretanto, que o fragmento estimado (431pb) foi obtido em todas as cepas desta espécie microbiana. Uma possível explicação para esse polimorfismo é a baixa estringência das condições de PCR utilizadas, onde a temperatura de anelamento foi de 42°C e o tempo de extensão foi de 4 minutos. Temperaturas de anelamento menores que 50°C podem possibilitar amplificações inespecíficas e, como a enzima *Taq* DNA polimerase apresenta uma velocidade de catálise média de 1000 bases por minuto, o tempo de extensão utilizado neste estudo também poderia estar acima do necessário para a síntese dos fragmentos propostos, o que possibilitaria que a enzima atuasse de forma inespecífica (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998). Estas condições de baixa estringência da reação, poderiam permitir que os *primers* ligassem a outros genes com seqüências similares ou parcialmente homólogas

Estas condições de reação foram adotadas, primeiramente, por que as temperaturas de anelamento, calculadas através da Equação 1 para os *primers* NUC3 e NUC4 foram 40 e 42°C, respectivamente. Em segundo lugar, para uniformizar as temperaturas de anelamento e os tempos de extensão dos quatro *primers* NUC e, em

terceiro, porque foram as condições que possibilitaram os melhores resultados para *S. hyicus*.

Outra explicação para esta alta variabilidade, seria que o gene alvo para os *primers* NUC3 e NUC4 (gene *nuc*) apresenta seqüências de bases nitrogenadas repetitivas, que permitiriam o anelamento dos *primers* em mais de um ponto, originando fragmentos amplificados com tamanhos diferentes. Entretanto esta hipótese é menos provável, pois a seqüência escolhida foi submetida a uma prévia análise computacional (Vector NTI) onde testaram-se os pontos de anelamento dos *primers* e verificou-se apenas uma única possibilidade de anelamento para cada oligonucleotídeo

Os *primers* NUC3 e NUC4 permitiram a diferenciação e a identificação de *S. intermedius*, pois houve amplificação apenas naquelas cepas caracterizadas, bioquimicamente, como *S. intermedius*, não ocorrendo nas outras duas espécies. Apesar do pequeno número de cepas testado, estes resultados demonstram que estes *primers* têm potencial para serem utilizados no estudo de identificação e diferenciação de ECP, havendo, no entanto, necessidade de otimização das condições de reação. A utilidade de genes específicos para identificação e diferenciação de *S. intermedius* também foi comprovada por Wakita *et al.* (2002) que, de forma semelhante a este trabalho, desenharam *primers* específicos para a região 16s do operon do rRNA e testaram a amplificação, por PCR, em 66 cepas de *S. intermedius*, 70 de *S. aureus* e 2 de *S. hyicus*, verificando que houve amplificação, apenas nas reações com DNA de cepas de *S. intermedius*.

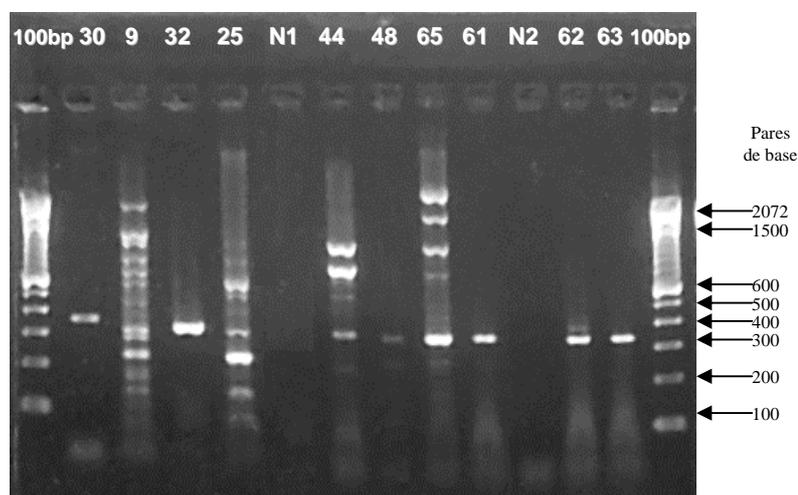


Figura 4 - Produtos de PCR obtidos com os *primers* NUC1-NUC2 (30, 32, 48, 61, 62 e 63) e NUC3-NUC4 (9, 25, 44 e 65), visualizados em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio, sob luz ultravioleta. 100 bp-padrão de peso molecular (100 bp DNA Ladder), N1-controle negativo 1 (água destilada esterilizada), N2-controle negativo 2 (cepa ATCC 10832, *S. aureus*), 9, 25, 44, 65 são os produtos PCR obtidos com as culturas de *S. intermedius* e 32, 30, 48, 61, 62 e 63 são os produtos PCR obtidos com as culturas de *S. hyicus*.

5.3 Comparação entre os Métodos Bioquímico e Molecular para a Diferenciação entre os Estafilococos Coagulase Positiva.

Para complementar os objetivos deste estudo, é necessária uma discussão dos resultados, visando comparar o método bioquímico e o método molecular utilizado para identificação e diferenciação entre as espécies *S. aureus*, *S. intermedius* e *S. hyicus*.

A análise dos resultados permite inferir que não existiu diferença, quanto a capacidade discriminatória, entre o método bioquímico e o método molecular baseado em PCR, já que as espécies foram identificadas e diferenciadas igualmente por ambos. Entretanto, deve-se levar em consideração que na maioria dos testes bioquímicos ocorreu variabilidade de resultados com a ocorrência de resultados falso-negativos, reflexo da ação de fatores ambientais sobre a expressão gênica conforme Farber *et al.*

(2001). As exceções foram os testes de resistência a acriflavina e da produção de β -galactosidade, que, por não apresentarem variabilidade nos resultados, foram os que demonstraram ter maior poder discriminatório para diferenciação entre *S. aureus*, *S. intermedius* e *S. hyicus*.

Os resultados obtidos com o método molecular também demonstraram grande variabilidade no tamanho e no número de fragmentos amplificados, entretanto, este fato não interferiu na identificação e diferenciação entre os ECP, pois a avaliação foi baseada na presença ou ausência de produtos de amplificação (bandas). Desta forma, os três pares de *primers* utilizados foram capazes de discriminar em nível de espécie. A Tab. 9 resume os testes que foram capazes de diferenciar as três espécies de ECP.

Tabela 9 – Diferenciação entre 65 cepas de Estafilococos coagulase positiva, através dos testes da resistência a acriflavina, da produção de β -galactosidade e da amplificação por PCR de seqüências dos genes *coa* e *nuc*

Número das cepas	Diferenciação bioquímica		Diferenciação molecular			Espécie
	β -galactosidade	Resistência a acriflavina	COAG1 COAG2	NUC1 NUC2	NUC3 NUC4	
1-8, 10-24, 26-29, 31, 33-43, 45-47, 49-60 e 64	-	-	+	-	-	<i>S. aureus</i>
32, 30, 48, 61, 62 e 63	-	+	-	+	-	<i>S. hyicus</i>
9, 25, 44 e 65	+	+	-	-	+	<i>S. intermedius</i>

Depois de estabelecida a estrutura laboratorial para ambos os métodos, o tempo de análise requerido é menor para o método baseado em PCR, comparado aos métodos bioquímicos. Com a metodologia molecular utilizada neste estudo, pode-se obter resultados em 24 horas, no entanto, estudos recentes têm proposto a análise

direta a partir de uma alíquota do alimento e 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). Com relação aos testes bioquímicos utilizados, a demanda de um tempo maior de análise, na maioria dos testes, decorreu da necessidade de um cultivo em caldo ou ágar nutritivo. Mesmo ao utilizar somente os testes da resistência a acriflavina e da produção de β -galactosidase, tendo em vista que devem ser avaliados em conjunto, necessita-se um período de cultivo, fazendo com que os testes demandem um tempo mínimo de realização de 48 horas.

A partir dos resultados obtidos pode-se sugerir que, para a identificação e diferenciação precisa entre os ECP, sejam realizados os testes da produção de coagulase livre e termonuclease, combinados a amplificação por PCR dos genes *coa* e *nuc*, utilizando os *primers* COAG2 e COAG3 para *S. aureus*, NUC1 e NUC2 para *S. hyicus* e NUC3 e NUC4 para *S. intermedius*. Entretanto, como ressaltam Matthews & Oliver (1994), a escolha de um método ou a sua eficácia não é, apenas, função da sua precisão, especificidade e sensibilidade, mas, também, da adequação aos propósitos da pesquisa, do nível de precisão desejado, da origem das cepas e da estrutura analítica disponível, ou seja: dependendo da situação e das condições disponíveis, a associação entre os testes da produção de coagulase livre e termonuclease com a resistência a acriflavina e a produção de β -galactosidase pode ser suficientemente satisfatória para diferenciação entre *S. aureus*, *S. hyicus* e *S. intermedius*.

6 CONCLUSÕES

a) a amplificação por PCR de seqüências dos genes *coa* e *nuc*, utilizando os *primers* COAG2, COAG3, NUC1, NUC2, NUC3 e NUC4, possibilitou a identificação e diferenciação entre as espécies *S. aureus*, *S. hyicus* e *S. intermedius*, através da presença ou ausência de fragmentos amplificados.

b) não foram verificadas diferenças, em relação ao poder discriminatório, entre a combinação dos testes bioquímicos e a amplificação por PCR com os genes *coa* e *nuc*.

c) os testes bioquímicos avaliados podem ser utilizados para a identificação e diferenciação entre *S. aureus*, *S. hyicus* e *S. intermedius*, desde que sejam aplicados e analisados em conjunto.

d) os testes da resistência a acriflavina e da atividade da β -galactosidase não apresentaram variabilidade de resultados, constituindo-se, em conjunto, como os melhores testes bioquímicos, dentre os avaliados neste estudo, para a diferenciação entre as espécies *S. aureus*, *S. hyicus* e *S. intermedius*.

7 REFERÊNCIAS

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.

ADEGOKE G. O.; OJO M. O. Biochemical characterization of staphylococci isolated from goats. **Veterinary Microbiol.**, v.7, n.463, p.463-470. 1982.

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

ANTONIOLO, 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.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). **Alimentos—contagem de *Staphylococcus aureus* em placas.** Rio de Janeiro: ABNT, 7. MB3464, 1991.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). *Staphylococcus aureus* in foods. In: HELRICH, K. **Official methods of analysis.** 15 Ed. Arlington: AOAC, 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.** 2001. 46f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) - Faculdade de Agronomia "Eliseu Maciel", Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

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.

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.

BEHME, R. J.; SHUTTLEWORTH, R.; MCNABB, A.; COLBY, W. D. Identification of staphylococci with a self-educating system using fatty acid analysis and biochemical tests. **J. Clin. Microbiol.**, v.34, p.3075-3084. 1996.

BELLOTI, V. **Mastite subclínica bovina: ocorrência, caracterização bioquímica e perfil plasmidal dos *Staphylococcus coagulase negativos*.** 1992. 96f. Dissertação (Mestrado em Ciências)– Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo.

BERGDOLL, M. S. Staphylococcal food poisoning. In: Dean, C. **Foodborne diseases**. 4 ed., San Diego: Academic Press, 1990. p.85-106.

BERGDOLL, M. S.; BENNETT, R. W. Staphylococcal enterotoxins. In: **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 2 ed., Washington: APHA, 1984. p. 428-457.

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.

BOARI, C. A.; PICCOLI-VALLE, R. H.; NASCIMENTO, A. R.; ALCÂNTARA, E. M. C. Ocorrência de cepas de estafilococos coagulase positiva formadoras de colônias atípicas em ágar Baird-Parker em queijos maturados. **B. Ceppa**, v.20, n.2, p. 347-354. 2002.

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.

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, nº 182, 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 República 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.

CHAPIN, K.C.; MURRAY, P. R. Media. 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.130, p.1687-1707.

CHIOU, C. S.; WEI, H. L.; YANG, L. C. Comparison of pulsed-field gel electrophoresis and coagulase gene restriction profile analysis techniques in the molecular typing of *Staphylococcus aureus*. **J. Clin. Microbiol.**, v.38, n.6, p.2186-2190. 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.

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. Baird-Parker medium supplemented with acriflavine, polymyxins and sulphonamide for the selective isolation of *Staphylococcus aureus* from heavily contaminated materials. **J. Appl. Bacteriol.**, v.50, p.351-357. 1981.

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.

FABER, J. M.; GENDEL, S. M.; TYLER, K. D.; BOERLIN, P.; LANDRY, W. L.; FRITSCHER, S. J.; BARRETT, T. J. Molecular typing and differentiation. In: **Compendium of Methods for the microbiological examination of foods**. American Public Health Association (APHA), 2001. Chap. 11, p.127-158.

FARUKI, H.; MURRAY, P. Medium dependence for rapid detection of thermonuclease activity in blood culture broths. **J. Clin. Microbiol.**, v.24, p.482-483. 1986.

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.

FRÉNAY, H. M. E.; BUNSCHOTEN, A. E.; SCHOOLS, 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.

GILL, J. P. S.; JOSHF, D. V.; KWATRA, M. S. Biotyping of *Staphylococcus aureus* strains isolated from food of animal origin. **Indian J. Animal Sciences**, v.64, n.7, p.668-671. 1994.

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.

GOH, S. H.; SANTUCCI, Z.; KLOOS, W. E.; FALTYN, M.; GEORGE, C. G.; DRIEDGER, D.; HEMMINGSEN, S. M.; Identification of *Staphylococcus* species and subspecies by the chaperonin 60 gene identification method and reverse checkerboard hybridization. **J. Clin. Microbiol.**, v.35, p.3116-3121.1997.

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**. 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.

HALPIN-DOHNALEK, M. I.; MARTH, E. H. *Staphylococcus aureus*: Production of extracellular compounds and behavior in foods - A review. **J. Food Prot.**, v.52, p.267-282. 1989.

HARMON, R. J.; LANGLOIS, B. E.; AKERS, K. A simple medium for the verification of identity of *Staphylococcus aureus* of bovine origin. **J. Dairy Sci.**, v.74, n. 202. 1991.

HARRIGAN, W. F. **Laboratory methods in food microbiology**. 3 ed. San Diego: Academic Press. 1998.

HENDERSON, A.; BRODIE, J. Investigations on staphylococcal coagulase. **Br. J. Esp. Pathol.**, v.44, p.524-528. 1963.

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

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.

HUI, Y. H.; GORHAM, J. R.; MURREL, K. D.; CLIVER, D. O. **Foodborne diseases handbook: diseases caused by bacterias**. New York: Marcel Decker Inc., 1994. 613p.

IANDOLO, J. J.; The genetics of staphylococcal toxins and virulence factors. In: GUNSALUS, I. C. **The bacteria**. New York: Academic Press, 1990. v.XI, p.399-426.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS (ICMSF). Leche y productos lacteos. In: **Ecología Microbiana de los alimentos: productos alimenticios**. Zaragoza: Editorial Acribia S.A., 1985. Cap. 18, p.472-525.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS (ICMSF). Microorganismos de los alimentos. In: **Características de los patógenos microbianos**. Zaragoza: Editorial Acribia S.A., 1996. p.349-386.

INVITROGEM - LIFE TECHNOLOGIES. Disponível em: <<http://www.invitrogen.com>>. Acesso em: 20 jan. 2002.

JABLONSKY, L. M.; BOHACH, G. A. *Staphylococcus aureus* In: DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L. R.; MONTVILLE, T. J. **Food Microbe: Fundamentals and frontier**. Washington: ASM Press, 1997. p.353-376.

JAY, J. M. Gastroenterites estafilocócica. In: **Microbiologia moderna de los alimentos**. 4 ed. Zaragoza: Editorial Acribia S. A., 1992. Cap. 19, p.537-563.

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.

JELJASZEWICZ, J.; SWITALSKI, L. M.; ADLAM, C. Staphylocoagulase and clumping factor. In: EASMON, C. S. F.; ADLAM, C. **Staphylococci and staphylococcal infections**. London: Academic Press, 1983. v.2, p.525-557.

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.

KIBENGE, F. S. B.; ROOD, J. I.; WILCOX, G. E. Lysogeny and other characteristics of *Staphylococcus hyicus* isolated from chickens **Veterinary Microbiol.**, v.8, p.411-415. 1983

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.

KLOOS, W. E.; JORGENSEN, J. H. Staphylococci. In: LENETTE, E. H.; BALOWS, A.; HAUSLER, W. J.; SHADOMY, H. J. **Manual of Clinical Microbiology**. 4 Ed. Washington: American Society for Microbiology, 1985. Cap.15, p.143-153.

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

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

LANGE, C.; CARDOSO, M.; SENCZEK, D.; SCHWARZ, S. Molecular subtyping of *Staphylococcus aureus* isolates from cases of bovine mastitis in Brazil. **Veterinary Microbiol.**, v.67 p.127-141, 1999.

LANGLOIS, B. E.; PARLINDUNGAN, A. K.; HARMON, R. J.; AKERS, K. Biochemical characteristics of *Staphylococcus* species of human and bovine origin. **J. Food Prot.**, v.53, n.2, p.119-126. 1990.

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.

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.

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.

MARTINEAU, F.; PICARD, F. J.; KE, D.; PARADIS, S.; ROY, P. H.; OUELLETTE, M.; BERGERON, M. G. Development of a PCR assay for identification of Staphylococci at genus and species levels. **J. Clin. Microbiol.**, v.39, n.7, p.2541-2547. 2001.

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'CONNOR, 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. Identificação and differentiation of coagulase-negative *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction. **J. Food Prot.**, v.60, n.6, p. 686-688, 1997.

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.

MORVAN, A., AUBERT, S., GODARD, C., ELSOLH, N. Contribution of typing method based on IS256 probing of *Sma*I 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. 2001.

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

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**. 1999. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

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

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.

REEVES, M. W.; DRUMMOND, M. C.; TAGER, M. Partial purification and characterization of multiple molecular forms of staphylococcal clotting activity (coagulase). **J. Bacteriol.**, v.148, p. 861-868. 1981.

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.

ROBERSON, J. R.; FOX, L. K.; HANCOCK, D. D.; GAY, J. M.; BESSER, T. E. Prevalence of coagulase-positive Staphylococci, other than *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis. **American J. Vet. Research**, v.57, n.1, p.54-58. 1996.

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.

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.

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.

TENOVER, F. C.; ARBEIT, R.; ARCHER, G.; BIDDLE, J.; BYRNE, S.; GOERING, R.; HANCOCK, G.; HEBERT, G. A.; HILL, B.; HOLLIS, R. Comparison of traditional and molecular methods of typing isolates of *Staphylococcus aureus*. **J. Clin. Microbiol.**, v.32, p.407-415. 1994.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SCHWARZKOPF, A.; KARCH, H. Genetic variation in *Staphylococcus aureus* coagulase genes: Potential and limits for use as an 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.

SHIMIZU, A.; FUJITA, M.; IGARASHI, H.; TAKAGI, M.; NAGASE, N.; SASAKI, A.; KAWANO, J. Characterization of *Staphylococcus aureus* coagulase type VII isolates from staphylococcal food poisoning outbreaks (1980-1995) in Tokyo, Japan, by pulsed-field gel electrophoresis. **J. Clin. Microbiol.**, v.38, n.10, p.3746-3749. 2000.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**, São Paulo: Livraria Varela, 1997. 296p.

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.; DESTRO, M. T.; LANDGRAF, M.; FRANCO, B. D. G. M. Biochemical characteristics of typical *Staphylococcus aureus* in mastitic milk and environmental samples of brazilian dairy farms. **Brazilian J. Microbiol.**, v.31, p.103-106. 2000.

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

SPEERS, D. J.; OLMA, T. R.; GILBERT, G. L. Evaluation of four methods for rapid identification of *Staphylococcus aureus* from blood cultures. **J. Clin. Microbiol.**, v.36, n.4, p.1032-1034. 1998

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.

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.

VANDERZANT, C.; SPLITTSTOESSER, D. F. **Compendium of methods for the microbiological examinations of foods.** 3 ed. Washington: American Public Health Association (APHA). 1992. 1912p.

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.

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

WAKITA, Y.; KAWANO, J.; SHIMIZU, A.; HÁJEK, V.; TOMISAKA, E.; YASUDA, R.; MATSUO, E. Development of a PCR test for the identification os *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.

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

APÊNDICES

APÊNDICE A - Produtos de PCR obtidos com os *Primers* COAG2 e COAG3.

