



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

CLONAGEM, EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE LIPASE DE *Staphylococcus xylosus* E DETECÇÃO DE GENES DE ENTEROTOXINAS DE *Staphylococcus aureus* ISOLADOS DE PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL

Marcia Regina Pelisser

**Florianópolis, SC
2008**

Marcia Regina Pelisser

CLONAGEM, EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE LIPASE DE *Staphylococcus xylosus* E DETECÇÃO DE GENES DE ENTEROTOXINAS DE *Staphylococcus aureus* ISOLADOS DE PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, como um dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciência dos Alimentos.

Orientadora: Prof^a Dra. Ana Carolina Maisonnave Arisi

**Florianópolis,
2008**

PELISSER, Marcia Regina.

Clonagem, expressão e purificação de lipase de *Staphylococcus xylosus* e detecção de genes de enterotoxinas de *Staphylococcus aureus* isolados de produtos de origem animal./ Marcia Regina Pelisser, Florianópolis, SC:2008. 111p.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2008.

Orientador: Doutora Ana Carolina Maisonnave Arisi (UFSC)

1. Lipase. 2. Recombinante. 3. Staphylococcus. 4. Enterotoxinas. 5. PCR multiplex.

MARCIA REGINA PELISSER

CLONAGEM, EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE LIPASE DE *Staphylococcus xylosus* E DETECÇÃO DE GENES DE ENTEROTOXINAS DE *Staphylococcus aureus* ISOLADOS DE PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL

Tese aprovada como requisito final para obtenção do título de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, pela comissão formada por:

Presidente: Professora Dra. Ana Carolina Maisonnave Arisi

Membro: Professor Dr. André Oliveira de Souza Lima

Membro: Professora Dra. Vera Lúcia Morés Hall

Membro: Professora Dra. Maria Risoleta Freire Marques

Membro: Professora Dr. Ernani Sebastião Sant'Anna

FLORIANÓPOLIS

2008

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos – CAL e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos PGCAL.

A Universidade do Contestado-UnC, Concórdia pelo incentivo e apoio financeiro para realização deste aperfeiçoamento.

Ao CNPq pelo financiamento dos projetos:

“ Expressão e purificação de lipases de *S. xylosum* e *L. plantarum*” processo número 476285/2007-0

“Novas lipases resilientes para produção de biodiesel a partir de rejeito de óleo de fritura” processo número 552508/2007-1

A FAPESC pelo financiamento do projeto, processo número FCTP1378/000,

“Detecção de genes de enterotoxinas de *Staphylococcus* spp. isolados de salame colonial produzidos na região do Alto Uruguai Catarinense”.

À minha orientadora Dra. Ana Carolina Maisonnave Arisi pela oportunidade de crescimento pessoal e profissional.

Ao Centro de Ciências Biológicas – CCB – UFSC, Departamento de Bioquímica, especialmente aos professores Dr. Hernán Francisco Terenzi e Dr. Javier Ignacio Vernal pela paciência e inúmeras contribuições na presente pesquisa.

Aos professores Dr. Ernani Sebastião Sant’Anna e Dra. Cleide Rosana Vieira Batista, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos – CCA, e professor Dr. Miguel Pedro Guerra, Departamento de Fitotecnia – CCA, pelo apoio e espaço cedido para realização de parte dos experimentos.

Ao Centro de Biotecnologia da UFRGS–Porto Alegre-RS onde foram realizados os seqüenciamentos das lipases.

Aos professores e funcionários do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFSC em especial ao secretário do Programa de Pós-Graduação Sérgio de Souza.

Ao professor Dr. André Oliveira de Souza Lima – CTTMar - Univali, pelas contribuições científicas no relato da tese.

Aos membros da comissão avaliadora pela disposição e seriedade, dividindo seus conhecimentos para o enriquecimento da pesquisa.

Aos amigos, diretores, coordenadores, professores, funcionários e alunos da UnC pela compreensão e flexibilidade de horários durante este período.

A Rosângela Triques e demais funcionários do Complexo Laboratorial de Ciência e Tecnologia da UnC pelo carinho e por estarem sempre prontos para auxiliar.

A todos os colegas do CAL e do CCB em especial a Andréia, Ângela, Maristela, Jaciara, Caroline, Regina, Eunice, Bianca, Manuela, Jeferson, Miguel, Gelson, Roberta, Patrícia, Viviane pela amizade e auxílio.

Ao meu colega de curso Fábio Cristiano Angonesi Brod, pela compreensão e o incansável apoio durante a realização dos experimentos e elaboração da tese.

Aos meus vizinhos e amigos do condomínio Jardim Albatroz - Bairro Córrego Grande, Florianópolis.

À minha família: marido, filho, pais, irmãos, sogra e sogro, cunhadas e cunhados, que sempre acreditaram em mim e me apoiaram em todas as etapas deste trabalho.

Muito Obrigada.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	VIII
LISTA DE TABELAS.....	IX
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	X
RESUMO.....	XII
ABSTRACT.....	XIII
CAPÍTULO I.....	14
1.1 INTRODUÇÃO	15
1.2 OBJETIVOS	17
1.3 REVISÃO DE LITERATURA	18
1.3.1 LIPASES	18
1.3.2 FONTES DE OBTENÇÃO.....	19
1.3.3 APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS DE LIPASES.....	21
1.3.4 ASPECTOS GENÉTICOS E ESTRUTURAIS GERAIS DE LIPASES.....	24
1.3.5 PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DE LIPASE RECOMBINANTE.....	28
1.4 MATERIAL E MÉTODOS	30
1.4.1 EXTRAÇÃO DE DNA TOTAL	30
1.4.2 AMPLIFICAÇÃO DO GENE DE LIPASE DE <i>STAPHYLOCOCCUS XYLOSUS</i>	30
1.4.3 CONSTRUÇÃO DO PGEMSYX E PGEMS4	31
1.4.4 SEQUENCIAMENTO DE NUCLEOTÍDEOS E ANÁLISE DA SEQUÊNCIA	31
1.4.5 CONSTRUÇÃO DO VETOR DE EXPRESSÃO - PET14B_LIP	32
1.4.6 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE LIPASE.....	32
1.4.7 DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLECULAR DA LIPASE RECOMBINANTE NA FORMA NATIVA POR FILTRAÇÃO EM GEL.....	33
1.4.8 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE LIPASE RECOMBINANTE DA LINHAGEM SELVAGEM S4	33
1.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
1.5.1 CONSTRUÇÃO DO VETOR DE EXPRESSÃO - PET14B_LIP	37
1.5.2 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE LIPASE.....	37
1.5.3 DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLECULAR POR FILTRAÇÃO EM GEL DA LIPASE RECOMBINANTE EM FORMA NATIVA.....	38
1.5.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA LIPASE RECOMBINANTE DA LINHAGEM SELVAGEM S4	39
1.6 CONCLUSÕES	41
1.7 REFERÊNCIAS	42
A) PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE DNA.....	47

B) SEQÜÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS DA LIPASE SXY E TRADUÇÃO DA SEQÜÊNCIA DE AMINOÁCIDOS .48	48
C) SEQÜÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS DA LIPASE S4 E TRADUÇÃO DA SEQÜÊNCIA DE AMINOÁCIDOS...49	49
D) MAPA DO PLASMÍDEO COM INSERTO	50
CAPÍTULO II	54
2.1 INTRODUÇÃO	55
2.2. OBJETIVOS	58
2.3 REVISÃO DE LITERATURA	59
2.3.1 <i>STAPHYLOCOCCUS</i> SPP.	59
2.3.2 ENTEROTOXINAS.....	61
2.3.3 ALIMENTOS ENVOLVIDOS EM INTOXICAÇÕES ESTAFILOCÓCICAS.....	64
<i>Salame (Lingüiça colonial)</i>	65
<i>Queijo mussarella, prato e colonial</i>	70
2.3. 4. MÉTODOS DE DETECÇÃO	73
<i>Gene femA</i>	74
2.4 MATERIAL E MÉTODOS	76
2.4.1 AMOSTRAS	76
2.4.2 QUANTIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>	76
2.4.3 DETECÇÃO ATRAVÉS DE PCR MULTIPLEX DE GENES DAS ENTEROTOXINAS CLÁSSICAS E <i>FEMA</i>	77
2.4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA	79
2.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	80
2.5.1 CONTAMINAÇÃO POR ESTAFILOCOCCOS COAGULASE POSITIVA – ECP	80
2.5.2 PADRONIZAÇÃO DOS PROTOCOLOS DE PCR	83
2.5.3 PCR MULTIPLEX PARA DETECÇÃO DE GENES DE ENTEROTOXINAS E <i>FEMA</i>	84
2.6 CONCLUSÕES	88
2.7 REFERÊNCIAS	89
ANEXOS	99
E) OCURRENCE OF <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> AND MULTIPLEX PCR DETECTION OF CLASSIC ENTEROTOXIN GENES IN CHEESE AND MEAT PRODUCTS.....	99

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Modelo estrutural da lipase de <i>Bacillus stearothermophilus</i>	25
Figura 2 – Alinhamento múltiplo de formas maduras de lipases de <i>Staphylococcus</i> spp.	27
Figura 3 – Amplificação com iniciadores LIP1 E LIP2 de DNA de <i>S. xylosus</i>	34
Figura 4 – Amplificação com iniciadores LIP1/LIP2 e LIPET1/LIPET2 de DNA de <i>S. xylosus</i>	35
Figura 5 - Alinhamento da seqüência de aminoácidos parte madura da lipase das linhagens Sxy (ATCC) e S4 (selvagem) com a sequência AF208229	36
Figura 6 - SDS-PAGE de lipase selvagem de <i>S.xylosus</i> purificada em coluna de Ni-NTA	38
Figura 7- Cromatografia de filtração em gel da lipase de <i>S. xylosus</i> (Superdex 200 Prep Grade).....	39
Figura 8 – Diferentes reações de PCR realizadas para amplificação dos genes alvos.	83
Figura 9 - PCR Multiplex de cepas ECP isoladas A) de queijo e B) de lingüiça colonial	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1– Bactérias descritas como produtoras de lipases	20
Tabela 2 – Aplicações industriais das lipases	22
Tabela 3 - Atividade específica da lipase de <i>S. xylosus</i> utilizando pNPC4 e pNPC16 como substratos	40
Tabela 4 – Seqüência dos iniciadores e tamanho dos produtos da PCR.....	78
Tabela 5- Protocolos de amplificação realizados com as amostras	78
Tabela 6- Amostras de derivados de leite com estafilococos coagulase positiva	80
Tabela 7 - Amostras de derivados de carne com estafilococos coagulase positiva	82
Tabela 8- Presença de genes <i>femA</i> , <i>sea</i> , <i>seb</i> , <i>sec</i> , <i>sed</i> e <i>see</i> em linhagens <i>de</i> estafilococos coagulase positiva (ECP) isolados de alimentos	85

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC - *American Type Culture Collection*

BL21 pLysS (DE3) - Linhagem de *E.coli* modificada geneticamente para superexpressar proteínas

ECP - Estafilococos coagulase positiva

EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético

femA - *Factor essential for methicillin resistance* – Fator essencial de resistência a meticilina

IPTG - *Isopropil-thio-β-D-galactopyranoside* – Isopropil-β- D-tiogalactopiranosídeo

LB - *Luria Bertani*

Lip1 e Lip2 - Nomenclatura para identificar os iniciadores utilizados na amplificação do fragmento de lipase

Lipet1 e Lipet2 - Nomenclatura para identificar os iniciadores utilizados para inserir os sítios de restrição para *XhoI* e *BamHI* no fragmento de lipase

pb - Pares de bases de DNA

PCR - *Polymerase Chain Reaction* – Reação em Cadeia da Polimerase

pET14b - vetor de expressão - plasmídeo

pET14_lip1 - plasmídeo pET14b com inserto S4 (linhagem selvagem)

pET14_lip2 - plasmídeo pET14b com inserto SXY (linhagem padrão ATCC 29971)

pGem -T easy - Sistema para clonagem, vetor

pGEMS4 - Plasmídeo pGem -T easy com inserto S4

pGEMSXY - Plasmídeo pGem -T easy com inserto SXY

PMSF - *Phenylmethanesulphonylfluoride* – Fluoreto fenil metano sulfonil

S4 – Gene de lipase amplificado a partir de linhagem de *Staphylococcus xylosus* isolado de lingüiça colonial

SDS – Dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante

SEA - Enterotoxina estafilocócica A

SEB - Enterotoxina estafilocócica B

SEC - Enterotoxina estafilocócica C

SED - Enterotoxina estafilocócica D

SEE - Enterotoxina estafilocócica E

Sxy - Gene de lipase amplificado a partir de linhagem de *Staplylococcus xylosus* (ATTC 29971)

TBE - Tampão Tris/borato/EDTA

TSST-1 - Toxina-1 da Síndrome do choque tóxico

UFC/g - Unidades Formadoras de Colônia por grama

PELISSER, M. R. **Clonagem, expressão e purificação de lipase de *Staphylococcus xylosus* e detecção de genes de enterotoxinas de *Staphylococcus aureus* isolados de produtos de origem animal.** 2008, 108p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos), Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

RESUMO

Staphylococcus xylosus é um microrganismo envolvido na fermentação de produtos cárneos e produtor de lipases extracelulares, que catalisam a hidrólise e a síntese de ésteres formados por glicerol e ácidos graxos e são ferramentas valiosas em biotecnologia. O objetivo deste trabalho foi clonar, expressar e purificar lipase recombinante de uma linhagem de *Staphylococcus xylosus* isolada de lingüiça colonial produzida no sul do Brasil. A extração de DNA foi realizada a partir de linhagens de *S. xylosus* isoladas de lingüiça colonial e de uma linhagem padrão de *S. xylosus* (ATCC 29971). Os fragmentos correspondentes a região madura da lipase (AF208229) foram amplificados (1,1 kb) e clonados em plasmídeo pGEM-T Easy. As seqüências obtidas apresentaram homologia de 99% com o gene de lipase de *S. xylosus* AF208229. Estes fragmentos que correspondem à região de codificação da lipase madura foram inseridos em um plasmídeo pET14b para construir as proteínas-fusão. As proteínas-fusão foram expressas em *E. coli* e purificadas em coluna de afinidade por metal imobilizado de níquel. As proteínas purificadas apresentaram atividade de lipase usando ésteres de p-nitrofenilpalmitato e p-nitrofenilbutirato como substratos. Desta forma, a lipase obtida a partir de *Staphylococcus xylosus* apresenta potencial de aplicabilidade na indústria de embutidos cárneos fermentados. Entre as bactérias predominantes envolvidas em doenças transmitidas por alimentos está a bactéria *Staphylococcus aureus* que produz enterotoxinas nos alimentos provocando intoxicação gastrointestinal. Os objetivos da pesquisa foram avaliar a contaminação por estafilococos coagulase positiva (ECP) em produtos cárneos e derivados de leite comercializados em Santa Catarina e detectar por PCR multiplex a presença dos genes que codificam as enterotoxinas SEA, SEB, SEC, SED e SEE e gene específico para espécie *S. aureus*. Foram coletadas 72 amostras de alimentos entre queijos tipo mussarella (15), prato (15) e colonial (15), lingüiça colonial (18) e salaminho (09) em estabelecimentos comerciais na região do Alto Uruguai Catarinense em Santa Catarina. Foram realizadas a contagem de estafilococos coagulase positiva (ECP) e a detecção por PCR dos genes específicos para *S. aureus* (*femA*) e para os genes (*sea*, *seb*, *sec*, *sed* e *see*) das enterotoxinas SEA, SEB, SEC, SED e SEE, a partir do DNA extraído de 102 cepas isoladas das amostras. A presença de ECP foi detectada em 33 amostras (45,8%) de produtos de origem animal analisadas e as contagens de ECP estavam acima do valor máximo permitido pela legislação (10^3 UFC.g⁻¹) em 22 amostras (30,5%). De 102 cepas isoladas ECP, para 91 (89,2%) cepas ocorreu a amplificação do gene *femA*. A amplificação dos genes *sea*, *sed* e *see* que codificam as enterotoxinas, ocorreu em 10, 12 e 4 cepas, respectivamente. Os resultados do presente trabalho confirmam que a PCR multiplex é um método rápido e sensível para análise de varredura de *Staphylococcus* coagulase positiva enterotoxigênico, sendo altamente específica. Este trabalho sugere que os produtos analisados podem conter as enterotoxinas SEA, SED e SEE e aponta a necessidade de melhoria na produção e nos sistemas de fiscalização dos produtos analisados.

Palavras-chave: lipase, recombinante, *Staphylococcus*, enterotoxinas, PCR multiplex.

PELISSER, M. R. **Cloning, expression and purification of lipase of *Staphylococcus xylosus* and detection of genes for enterotoxins of *Staphylococcus aureus* isolated from animal products.** 2008, 108p. Thesis (Ph.D. in Food Science), the Graduate Program in Food Science, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianopolis.

ABSTRACT

Staphylococcus xylosus causes fermentation in meat products and produces extracellular lipases which catalyze hydrolysis and synthesis from esters formed by glycerol and fatty acids. These lipases are also valuable tools to biotechnology. The aim of this work was cloning, sequencing and express a *S. xylosus* recombinant lipase. The DNA extraction was made from *S. xylosus* strains isolated from artisanal salami and from a *S. xylosus* standard strain (ATCC 29971). Fragments corresponding to a mature lipase (AF208229) were amplified (1.1 kb) and cloned into pGEM-T Easy plasmid. The sequences obtained showed 99% homology with the lipase gene of *S. xylosus* AF208229. Fragments corresponding to the mature region of lipase were inserted into a pET14b plasmid to build fusion proteins containing histidine tail. Fusion-proteins were expressed into *E. coli* and then purified with nickel affinity column. Purified proteins showed lipase activity using p-nitrophenilpalmitate and p-nitrophenilbutirate esters as substrates. The lipase obtained from *Staphylococcus xylosus* has a potential applicability in the fermented meat industry. The other organism studied was *Staphylococcus aureus* which is involved in food diseases and produce enterotoxins in food causing gastrointestinal poisoning. Contamination by coagulase-positive Staphylococci (CPS) in meat and milk-derived products commercialized in Santa Catarina, Brazil was evaluated and the presence of genes for classical staphylococcal enterotoxins A, B, C, D and E (*sea*, *seb*, *sec*, *sed* and *see*) and for gene *femA*, specific for *S. aureus* species, by multiplex PCR, detected. A total of 72 food samples including mozzarella (15 samples), American cheese (15 samples), colonial cheese (15 samples), colonial sausage (18 samples) and salaminho (09 samples) were analysed. Of 102 strains isolated CPS, for 91 (89.2%) strains of gene amplification occurred at *femA*. The amplification of genes *sea*, *sed* and *see* coding for enterotoxins, occurred in 10, 12 and 4 strains, respectively. Results of the present work confirm that multiplex PCR is a rapid and sensitive method for screening of enterotoxigenic coagulase-positive Staphylococci, being highly specific. Results also indicate that better hygiene practices and better inspection are required in the production of the foods included in the study.

Keywords: lipase, recombinant, Staphylococcus, enterotoxins, PCR multiplex

CAPÍTULO I
Clonagem, expressão e purificação e de lipase recombinante de
Staphylococcus xylosus

1.1 INTRODUÇÃO

As triacilglicerol hidrolases lipases (EC 3.1.1.3) ou simplesmente lipases são enzimas que catalisam a hidrólise e a síntese de ésteres formados a partir de glicerol e ácidos graxos de cadeia longa, sendo as enzimas com a mais ampla utilização em biocatálise (SECUNDO et al., 2006). Apesar da ampla distribuição e ocorrência em várias espécies, as lipases de origem microbiana têm maior potencial industrial e muitas vezes são mais úteis que as enzimas provenientes de outras fontes devido à sua especificidade por substratos e capacidade de se manter ativa em solventes orgânicos, além de alto rendimento e facilidade de manipulação genética (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006).

Além disso, lipases bacterianas são enzimas preferenciais para inúmeras reações nas indústrias devido ao seu potencial catalítico em reações aquosas e não-aquosas (ROUSTAN et al., 2005). Lipases atuam na interface lipídeo-água. A tríade catalítica que é composta de Ser-Asp/Glu-His, geralmente ocorrendo na seqüência consenso Gly(Ala)-X-Ser-Gly-X encontrada em torno do sítio ativo Serina. As estruturas tridimensionais das lipases revelam a característica tridimensional motivo α/β (TIESINGA et al., 2007; TYNDALL et al., 2002).

Embora a atividade da lipase seja definida como a habilidade de hidrolisar triglicerídeos, em certas condições experimentais as lipases podem catalisar esterificação ou transesterificação. Existe um interesse particular em lipases capazes de catalisar a transesterificação e a síntese de ésteres para produção de derivados de alto valor agregado (GUPTA; GUPTA; RATHI, 2004; ROSENSTEIN; GOTZ, 2000; ROUSTAN et al., 2005). Cada aplicação requer propriedades únicas em relação à especificidade, estabilidade, temperatura e dependência de pH (CHAKRABORTY; RAJ, 2008). Para usar qualquer lipase para hidrólise, esterificação ou qualquer outra aplicação, é essencial a produção de enzima purificada em alta concentração e caracterizar esta enzima bioquimicamente.

No entanto, apenas 2% dos microrganismos têm suas enzimas testadas e lipases com origem diferente tem uma grande variação na sua atividade enzimática, como especificidade a ácidos graxos, temperatura, pH, etc. (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006).

Staphylococcus xylosus é uma espécie *Staphylococcus* coagulase negativa que é comumente isolada de produtos cárneos fermentados (FIORENTINI 2008; IACUMIN et al., 2006; KOZACINSKI et al., 2008; MOROT-BIZOT et al., 2003; RANTSIOU et al., 2005; SIMONOVÁ et al., 2006). Nesses produtos, *Staphylococcus* spp. são responsáveis pela estabilização de cor, decomposição de peróxidos e formação de aroma devido a suas atividades proteolíticas e lipolíticas (IACUMIN et al., 2006; TALON et al., 1999). De acordo com Montel et al. (1996) vários estafilococos, incluindo *Staphylococcus xylosus*, produzem lipases que são capazes de liberar ácidos graxos responsáveis pelo aroma dos salames fermentados. Mosbah et al. (2005) purificaram e caracterizaram uma lipase de *S. xylosus* (AF701336) isolada a partir de resíduos de uma indústria de óleos. Rosenstein e Götz (2000) publicaram a seqüência do gene *gehM* correspondente à lipase AF208229 (NCBI) de *S. xylosus* (linhagem DSM 20266), no entanto, esta lipase nunca foi totalmente caracterizada. Iacumin et al. (2007) apresentaram estudos preliminares sobre a expressão do gene *gehM* de lipase de *S. xylosus* e sugeriram que uma concentração aumentada de triglicerídeos no meio de cultura suprime a expressão do gene da lipase. Portanto, o objetivo do presente trabalho foi clonar, expressar e purificar o gene que codifica para uma lipase de *S. xylosus* isolada de lingüiça colonial.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

Clonar, expressar e purificar lipase recombinante de uma linhagem de *Staphylococcus xylosus* isolada de lingüiça colonial, produzida no sul do Brasil.

1.2.1 Objetivos específicos

- Extrair DNA de diferentes linhagens de *Staphylococcus xylosus*.
- Realizar a PCR com iniciadores específicos para um gene que codifica uma lipase.
- Clonar as seqüências de DNA amplificadas por PCR no vetor pGEM –T Easy.
- Sequenciar os fragmentos amplificados.
- Realizar a clonagem do DNA complementar em um vetor de expressão.
- Expressar a proteína-fusão contendo cauda de afinidade N-terminal.
- Obter a proteína-fusão em forma solúvel.
- Purificar a proteína-fusão em colunas de afinidade com níquel.

1.3 REVISÃO DE LITERATURA

1.3.1 Lipases

Lipase é o nome genérico para um grupo de enzimas pertencentes à classe das hidrolases (E.C.3.1) e que atuam sobre ligações éster (E.C. 3.1.1) de vários compostos, sendo os acilgliceróis seus melhores substratos (JAEGER; REETZ, 1998; JAEGER; DIJKSTRA; REETZ, 1999).

As triacilglicerol hidrolases lipases (E.C.3.1.1.3) de interesse nesta pesquisa são descritas como glicerol éster hidrolases que atuam sobre ligações éster presentes em acilgliceróis, liberando ácidos graxos e glicerol constituindo uma classe especial entre as carboxil éster hidrolases (GUPTA; GUPTA; RATHI, 2004; JAEGER; DIJKSTRA; REETZ, 1999).

No entanto, as lipases são capazes de catalisar não apenas reações de hidrólise, mas também de síntese em meios aquo-restritos, como reações de esterificação, interesterificação, transesterificação, alcoólise e aminólise, e por atuar sobre substratos não naturais (MOSBAH et al., 2005).

Conforme a classificação das enzimas, segundo Paques; Macedo (2006) as lipases são divididas em:

1- Regiosseletivas - subdivididas em:

- a) lipases não-específicas - hidrolisam ésteres de ácidos graxos primários ou secundários, liberando ácidos graxos na posição 1(3) ou 2;
- b) lipases 1,3-específicas - hidrolisam apenas ésteres de ácidos graxos primários, isto é, na posição 1 ou 3;

2- Tipo-seletivas com relação ao tamanho da cadeia carbônica e/ou ao número de insaturação do grupo acila;

3- Enantioseletivas.

As lipases têm sido definidas, simplesmente como carboxilesterases que hidrolisam acilgliceróis de cadeia longa. A hidrólise ou síntese de triacilgliceróis, constituídos por ácidos graxos com menos do que 10 carbonos é catalisada com maior frequência por esterases (JAEGER; DIJKSTRA; REETZ, 1999). A diferenciação entre lipases e esterases também tem sido feita pela diferença de especificidade preferencial

das duas enzimas. Os substratos naturais para lipases são óleos e gorduras contendo triacilgliceróis constituídos de ácidos graxos de cadeia longa, ou seja, ligações éster tríplices, enquanto esterases atuam sobre ligações éster únicas, liberando ácidos graxos de baixa massa molar. Deve-se enfatizar, entretanto, que a maioria das lipases pode hidrolisar os substratos de esterases, enquanto o inverso não é verdadeiro (JAEGER; DIJKSTRA; REETZ, 1999).

1.3.2 Fontes de obtenção

As lipases são comumente encontradas na natureza, podendo ser obtidas a partir de fontes animais, vegetais e microbianas. Em eucariontes superiores, elas estão envolvidas em várias etapas do metabolismo de lipídeos, em processos de digestão, absorção, reconstituição e metabolismo lipoprotéico. Nas plantas, são encontradas em tecidos de reserva (SHARMA, CHISTI, BANERJEE, 2001).

As lipases de origem microbiana, principalmente de fungos e bactérias são amplamente utilizadas, apresentando muitas aplicações em biotecnologia (GUPTA; GUPTA; RATHI, 2004). Este enorme potencial biotecnológico das lipases microbianas inclui o fato de que elas são estáveis em solventes orgânicos, não necessitam de cofatores, apresentam enantioseletividade e especificidade de substratos e são de fácil manipulação genética (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006; JAEGER; REETZ, 1998; SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001). Segundo Mosbah et al. (2006), genes de lipase de *Staphylococcus aureus*, *S. hyicus*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. simulans* e *S. xylosus* têm sido clonados e seqüenciados, devido principalmente ao interesse na área da saúde e suas aplicações biotecnológicas.

As fontes fúngicas, utilizadas na área de alimentos, não são nocivas à saúde humana, sendo reconhecidas como GRAS (Generally Regarded as Safe). Fungos de diversas espécies como *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Mucor javanicus*, *Rhizopus niveus*, *Rhizopus oryzae*, *Penicillium camembertii*, *Penicillium roqueforti*, *Penicillium cyclopium*, *Penicillium simplicissimum*, *Galactomyces geotrichum*, *Candida rugosa*, *Candida cylindracea*, *Pichia burtonii* demonstraram ser bons produtores de lipases e as suas enzimas têm sido estudadas sob o ponto de vista acadêmico e

industrial (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006; JAEGER; REETZ, 1998; FERNÁNDEZ et al., 2006; LEE et al., 2007; LORENZO et al., 2005; OLEMPKA-BEER et al., 2006).

Existem mais de 4000 enzimas conhecidas e destas, mais de 200 encontram utilização comercial, sendo que a maior parte das enzimas de interesse industrial possui origem microbiana (SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001). Embora exista um número considerável de bactérias produtoras de lipase (Tabela 1) poucas são exploradas comercialmente como linhagens selvagens ou recombinantes, sendo as mais importantes: *Alcaligenes*, *Arthobacter*, *Achromobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Chromobacterium*, *Pseudomonas* (GUPTA; GUPTA; RATHI, 2004; JAEGER; REETZ, 1998; SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001). O rápido crescimento bacteriano celular, em relação aos fungos, é uma das vantagens das fontes bacterianas como produtoras de enzimas lipolíticas (JAEGER; DIJKSTRA; REETZ, 1999).

Tabela 1– Bactérias descritas como produtoras de lipases

<i>Achromobacter lipolyticum</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Moraxella sp.</i>	<i>Pseudomonas pseudomallei</i>
<i>Acinetobacter sp.</i>	<i>Bacillus thaiminolyticus</i>	<i>Mycobacterium immobilis</i>	<i>Pseudomonas wisconsinensis</i>
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	<i>Bacillus thermocatenulatus</i>	<i>Pasteurella multocida</i>	<i>Psychrobacter chelonae</i>
<i>Acinetobacter radioresistens</i>	<i>Brochothrix thermosphacta</i>	<i>Propionibacterium acnes</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Alcaligenes denitrificans</i>	<i>Burkholderia glumae</i>	<i>Propionibacterium avidium</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>Archaeglobus fulgidus</i>	<i>Chromobacterium violaceum</i>	<i>Propionibacterium granulosum</i>	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>
<i>Bacillus alcalophilus</i>	<i>Chromobacterium viscosum</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Staphylococcus hyicus</i>
<i>Bacillus atrophaeus</i>	<i>Corynebacterium acnes</i>	<i>Pseudomonas aureofaciens</i>	<i>Staphylococcus warneri</i>
<i>Bacillus megaterium</i>	<i>Cryptococcus laurentii</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Staphylococcus xylosus</i>
<i>Bacillus laterosporus</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Pseudomonas fragi</i>	<i>Serratia marcescens</i>
<i>Bacillus pumilus</i>	<i>Lactobacillus curvatus</i>	<i>Pseudomonas luteola</i>	<i>Streptomyces exfoliatus</i>
<i>Bacillus sphaericus</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Pseudomonas mendocina</i>	<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	<i>Microthrix parvicella</i>	<i>P. nitroreducens var. thermotolerans</i>	<i>Vibrio cholerae</i>

Fonte: GUPTA; GUPTA; RATHI (2004)

1.3.3 Aplicações biotecnológicas de lipases

As lipases são consideradas excelentes biocatalisadores em numerosos processos industriais nas mais diversas áreas (Tabela 2), tais como alimentos, processos farmacêuticos, formulação de detergentes, oleoquímica, agroquímica, cosméticos, manufatura de papéis, couro, entre outras (CASTRO; MENDES; SANTOS, 2004; KOBLITZ, 2003; PASTORE; COSTA; ROSENSTEIN; GOTZ, 2000). Ainda podem ser ferramentas úteis na fabricação de biossensores para utilização em análises clínicas, análises de alimentos, análises químicas, de contaminação ou poluição de ambientes (PANDEY et al., 1999). Além disso, as lipases têm sido utilizadas na degradação biológica e remoção de carga lipolítica de efluentes industriais de alimentos em geral (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006; PANDEY et al., 1999;).

Lipases microbianas são amplamente diversificadas em suas propriedades enzimáticas, especificidade por substrato e habilidade de catalisar não apenas a hidrólise mas também a síntese de ácidos graxos, tornando-se muito atrativa para aplicações comerciais (GUPTA; GUPTA; RATHI, 2004; ROSENSTEIN; GOETZ, 2000;). A utilização da lipases como aditivos em detergentes, aproximadamente 1000 toneladas por ano, ainda representa a maior aplicação industrial destas enzimas (JAEGER; DIJKSTRA; REETZ, 1999; KIRK; BORCHERT; FUGLSANG, 2002).

Tabela 2 – Aplicações industriais das lipases

Áreas	Aplicação
Laticínio	Hidrólise da gordura do leite Melhoria do aroma, da qualidade e vida de prateleira
Panificação	Melhoramento do sabor/qualidade, prolongamento da vida de prateleira. Confeitos e bolos
Bebidas	Melhoria do aroma e aceleração do processo fermentativo, por remoção de lipídeos. Bebidas alcoólicas
Molhos e condimentos	Aumento de propriedade funcionais da gema de ovo
Processamento de carnes	Desenvolvimento de aromas e redução de excesso de gorduras. Produtos embutidos
Óleos e gorduras	Transesterificação de óleos – introdução de ácidos graxos de interesse em óleos e gorduras naturais. Hidrólise de óleos (ácidos graxos), diglicerídeos e monoglicerídeos
Química fina	Síntese de ésteres e resolução de racematos
Detergentes	Hidrólise de gorduras
Farmacêutica	Transesterificação, hidrólise. Cefalosporinas, penicilinas naproxeno, ibuprofeno hidantoínas, patuloide A rapamicina-42, lamivudina vitamina D
Médica	Determinação de lipídios no sangue (biosensores)
Cosmético	Remoção de lipídeos
Curtume	Remoção de gordura da matéria-prima
Tratamento de resíduos	Decomposição de lipídeos de efluentes

Fonte: CASTRO; MENDES; SANTOS (2004); PASTORE; COSTA; KOBLITZ (2003)

As lipases são enzimas aplicadas no processamento de óleos e gorduras, uma vez que óleos com triacilgliceróis estruturados e propriedades físico-químicas alteradas possuem um grande potencial na indústria de alimentos. Lipases têm sido utilizadas para hidrólise seletiva de ácidos graxos, seguida da síntese de novas ligações éster, construindo assim triacilgliceróis com características distintas das originais e de interesse para um dado alimento. Assim, pela ação de uma enzima lipolítica, um triacilglicerol que inicialmente constituía-se, por exemplo, dos ácidos palmítico-oléico-esteárico, pode tornar-se esteárico-oléico-esteárico, com modificação das propriedades funcionais do produto (JAEGER; REETZ, 1998; PANDEY et al., 1999).

Óleos de qualidade inferior poderiam ser modificados para sintetizar triacilgliceróis estruturados e nutricionalmente importantes como substitutos de manteiga de cacau, triacilgliceróis de baixas calorias e óleos enriquecidos com ácido oléico. Modificações mediadas por lipases, como a interesterificação, irão ocupar um lugar proeminente na indústria de óleos, uma vez que estas modificações enzimáticas são específicas e podem ser executadas em condições de reações moderadas (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006). Além de preservar a posição 2 do glicerol, predominantemente rica em ácidos graxos essenciais na maioria dos óleos vegetais e de maior biodisponibilidade, por corresponder à posição mais facilmente absorvida pelo organismo, na forma de monoacilglicerol (PAQUES; MACEDO, 2006).

A lipase é responsável pela formação do aroma distinto no preparo de queijos do tipo *Cheddar*, para produzir substitutos de manteiga e outros aditivos usados na manufatura de cereais, balas, aperitivos e bolos. Hidrolisados deste tipo de gordura têm sido extensivamente utilizados em cereais, molhos, aperitivos e assados em geral, resultando em produtos com melhor aroma e maior aceitabilidade pelos consumidores (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006; JAEGER; REETZ, 1998).

A hidrólise seletiva da gordura do leite também é um exemplo de aplicação de lipases. O declínio do consumo *per capita* de gorduras do leite em diversos países e a demanda por leite e derivados com menores teores de gorduras têm aumentado a necessidade e o interesse do setor industrial em encontrar alternativas para o aproveitamento destas gorduras (CASTRO; MENDES; SANTOS, 2004).

Outro campo de aplicação de lipase, com boa perspectiva de crescimento, é na indústria de panificação. O uso de lipase 1,3-específica tem um excelente efeito condicionador da massa, facilitando o seu manuseio em máquinas convencionais da indústria de panificação. Além disso, aumenta o volume do pão, melhora a textura do miolo e confere ao mesmo uma cor mais branca. Nesta aplicação, a lipase degrada os lipídeos do trigo, modificando sua interação com o glúten, permitindo que o glúten obtenha uma rede mais forte e mais elástica. Lipases de *A. niger*, *R. oryzae*, *C. cylindracea* são atualmente utilizadas na indústria da panificação (CASTRO; MENDES; SANTOS, 2004; HASAN; SHAH; HAMEED, 2006).

Na produção de embutidos fermentados, como o salame, a aplicação de lipases de *Rhizomucor miehei* apresenta também aspectos econômicos positivos, uma vez que proporciona redução do tempo de maturação, com manutenção de características

analíticas e sensoriais (PANDEY et al., 1999). As lipases também desempenham um papel importante nas etapas fermentativas da produção de embutidos cárneos, determinando mudanças na liberação de ácidos graxos de cadeia longa durante a cura. (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006).

A lipase de *Staphylococcus xylosus* é particularmente importante na produção de compostos aromáticos muito desejáveis em embutidos cárneos. O *S. xylosus* é utilizado como cultura iniciadora em embutidos cárneos fermentados para estabilizar a cor e contribuir no desenvolvimento do aroma (MARTÍN et al., 2005; RANTSIOU et al., 2005).

Fiorentini (2008) caracterizou linhagens de *Staphylococcus xylosus* e suas propriedades tecnológicas e aplicabilidade como cultura iniciadora em produtos cárneos. Entre as propriedades descritas estão a habilidade em reduzir nitratos e nitritos, crescimento na presença de NaCl e NaNO₂ e atividades positivas de catalase e lipase, apresentando potencial para uso como cultivos iniciadores em embutidos fermentados.

1.3.4 Aspectos genéticos e estruturais gerais de lipases

Devido às várias possibilidades de aplicação das lipases, estas enzimas têm sido amplamente estudadas. Diversas lipases tiveram suas seqüências de nucleotídeos e aminoácidos determinadas e depositadas no banco de dados do NCBI (*The National Center for Biotechnology Information*). Em alguns casos, estruturas tridimensionais também já estão disponíveis como as lipases de *Bukholderia (Pseudomonas) cepacia*, *Pseudomonas glumae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Chromobacterium viscosum*, *Bacillus stearothermophilus* (Figura 1), *Bacillus subtilis* (TYNDALL et al., 2002). Recentemente, Tiesinga et al. (2007) apresentaram a estrutura tridimensional da lipase de *Staphylococcus hyicus*.

A elucidação das estruturas tridimensionais de algumas lipases por cristalografia de raios X proporciona melhor entendimento a respeito do mecanismo de ação dessas enzimas. As lipases são α/β -proteínas, formadas por um domínio de folhas β -pregueadas, dispostas paralelamente, interligadas e circundadas por α -hélices. O sítio ativo da lipase é formado por uma tríade catalítica constituída pelos aminoácidos: serina, ácido aspártico (ou glutâmico) e histidina (JAEGER; DIJKSTRA; REETZ, 1999).

O resíduo nucleofílico serina é localizado no C-terminal da fita $\beta 5$ de um pentapeptídeo GX SXG altamente conservado, formando uma característica principal “ β em torno de α ”, designada como a cavidade nucleofílica (CASTRO; MENDES; SANTOS, 2004; JAEGER; DIJKSTRA; REETZ, 1999; TYNDALL et al., 2002).

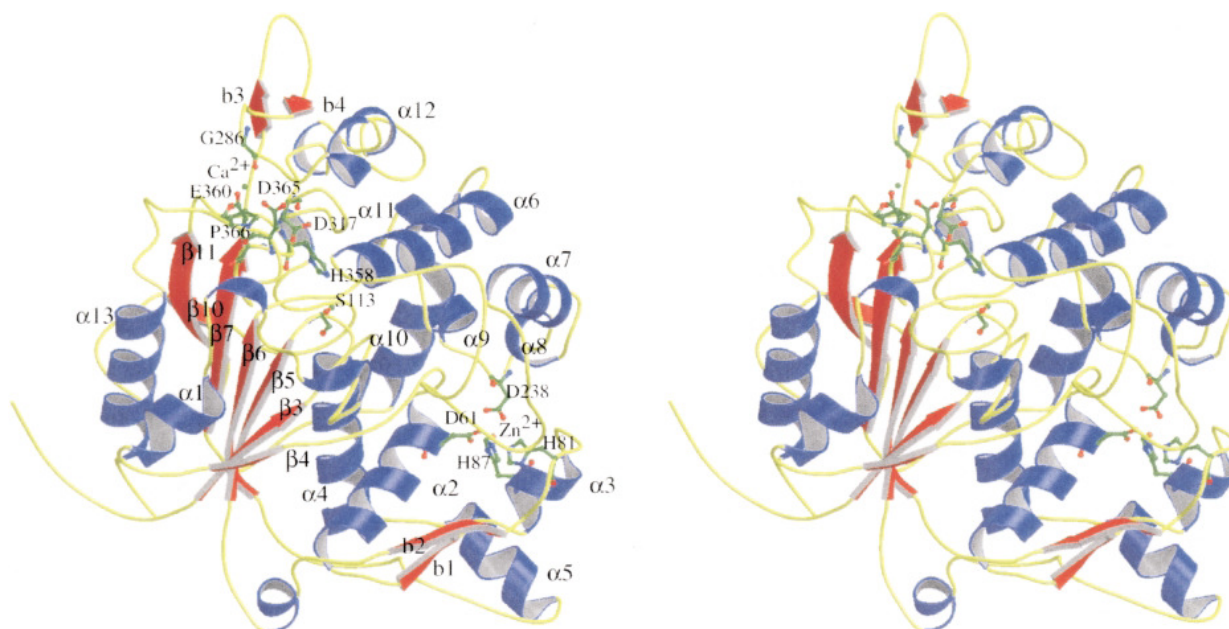


Figura 1 Modelo estrutural da lipase de *Bacillus stearothermophilus*

Fonte: Tyndall et al. (2002)

Na figura as fitas β são representadas por flechas vermelhas e α -hélices como espirais azuis. Os resíduos marcados, da esquerda para a direita, Glu360, Gly286, Pro366 e Asp365 com cálcio em verde, a tríade catalítica consiste em Asp317, His358 e Ser311.

O interesse na produção de lipases por *Staphylococcus* spp. teve origem com a observação da atividade lipolítica das espécies patogênicas (MOSBAH et al., 2006). É conhecido que o *Staphylococcus aureus* causa algumas doenças infecciosas tais como furúnculos, pneumonia, osteomielites e meningites. Desta forma, as lipases de *Staphylococcus* spp. são importantes devido ao envolvimento em alguns processos patogênicos e devido ao considerável interesse nas aplicações biotecnológicas (MOSBAH et al., 2005; SAYARI et al., 2007).

Várias lipases estafilocócicas tem sido purificadas incluindo as espécies de *S. hyicus*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. warneri*, *S. haemolyticus*, *S. simulans* e *S. xylosus* e suas propriedades bioquímicas tem sido estudadas. E a comparação entre estas lipases estafilocócicas mostrou importantes diferenças em suas características bioquímicas, tais como seletividade no comprimento da cadeia, especificidade de substratos e afinidade por íons de cálcio (FRIKHA et al., 2008).

Rosenstein e Goetz (2000) realizaram uma comparação das seqüências de aminoácidos de lipases de *Staphylococcus* spp. (Figura 2) revelando valores de similaridade entres as partes maduras apresentando variação de identidade de 50 a 81%. Todas as lipases são similarmente organizadas como pré-pró-proteínas, com pré-regiões correspondendo a um peptídeo sinal de 35 a 38 aminoácidos, um pró-peptídeo de 207 a 321 aminoácidos com um caráter hidrofílico e um peptídeo maduro contendo 383 a 396 aminoácidos. As lipases são secretadas na forma pró e são posteriormente processadas à forma madura por proteases específicas (ROSENSTEIN; GÖTZ, 2000).

A estrutura tridimensional de lipase de *Staphylococcus xylosus* não foi descrita até o momento, o que compromete o entendimento da relação estrutura-função. Assumindo que as lipases estafilocócicas pertencem à classe das α/β -hidrolases, Mosbah et al. (2005) propõe a comparação de seqüências de lipases estafilocócicas com as lipases de *Burkholderia glumae*, para realizar estudo de similaridade entre as lipases, das quais as estruturas tridimensionais já são conhecidas. Atualmente, é possível realizar a comparação estrutural de seqüências de lipases estafilocócicas entre si, pois Tiesinga et al. (2007) descreveram a primeira estrutura tridimensional de uma lipase de *Staphylococcus hyicus*.

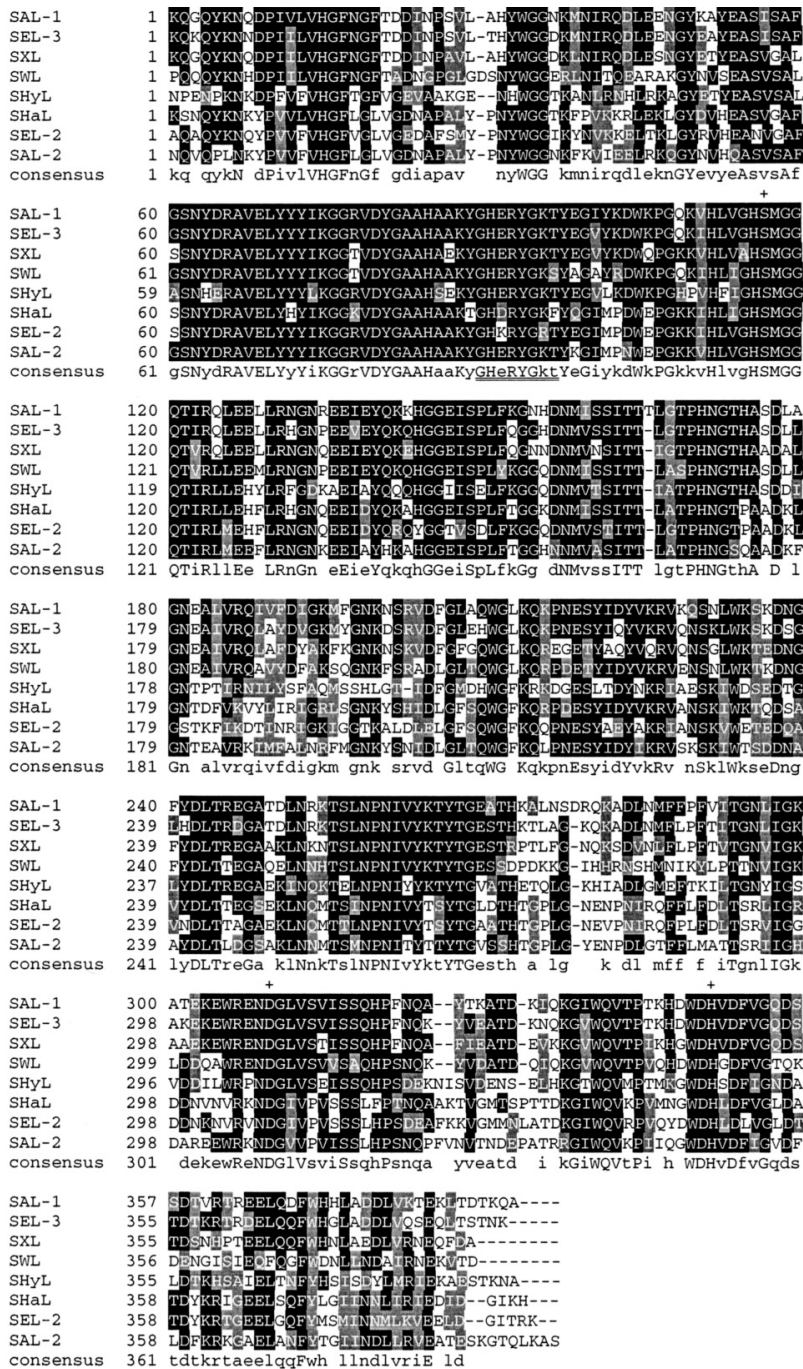


Figura 2 – Alinhamento múltiplo de formas maduras de lipases de *Staphylococcus* spp.

Fonte: ROSENSTEIN; GOETZ (2000)

Os resíduos conservados que provavelmente formam a tríade catalítica estão indicados com o sinal de (+) acima das sequências alinhadas. *S. aureus* NCTC 8530, SAL-1; *S. aureus* PS54, SAL-2; *S. epidermidis* 9 (GehC), SEL-1; *S. epidermidis* 9 (GehD), SEL-2; *S. epidermidis* RP62A, SEL-3; *S. haemolyticus*, SHaL; *S. hyicus*, SHyL; *S. warneri*, SWL; and *S. xylosus*, SXL.

Em preto os resíduos conservados e em cinza os diferentes.

1.3.5 Produção e purificação de lipase recombinante

A obtenção de proteína purificada a partir da seqüência de DNA codante necessita das seguintes etapas: clonagem do DNA complementar em um vetor de expressão; expressão da proteína-fusão contendo cauda de afinidade N-terminal ou C-terminal; obtenção da proteína-fusão; purificação da proteína-fusão em colunas de afinidade; verificação do grau de pureza da proteína obtida.

Para facilitar a purificação de proteínas, um procedimento utilizado é expressar a proteína de interesse fusionada a uma cauda específica que permite sua purificação em coluna por cromatografia de afinidade, pois a cauda se liga especificamente à resina da coluna, restando a proteína-fusão. A introdução da cauda de afinidade pode proporcionar efeitos positivos nas propriedades bioquímicas das proteínas, como por exemplo, a melhora do rendimento, prevenção da proteólise, aumento da solubilidade (ARNAU et al., 2006). No entanto, efeitos negativos também são relatados como a alteração na conformação da proteína, redução do rendimento, inibição da atividade biológica, entre outros. Em função disso, é usualmente desejável remover a cauda de afinidade após o processo de purificação (ARNAU et al., 2006).

Entre os vetores usados com sucesso para produção de proteínas-fusão podemos citar: pGEX (glutathione-S-transferase), pMAL (proteína ligante de maltose), pET (polihistidina) e pUR (fragmento da β -galactosidase). O pET apresenta como vantagem uma cauda de polihistidina de pequeno volume, que é a mais popular e efetiva para estudos de estrutura (ABOLA et al., 2000). Entre os diferentes hospedeiros para expressar as proteínas heterólogas podemos citar *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, células de insetos, mamíferos e células vegetais (ARNAU et al., 2006).

Diversas estratégias têm sido empregadas para purificação de lipases (GUPTA; GUPTA; RATHI, 2004; MACIEL et al., 2004; MOSBAH et al., 2005; SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001; VAN KAMPEN et al., 2001;). No entanto, apesar da disponibilidade de diferentes métodos de purificação de proteínas, atualmente a técnica por cromatografia tem sido utilizada com freqüência devido ao elevado poder de resolução. A escolha do tipo de cromatografia depende das características biológicas e físico-químicas da molécula da proteína como tamanho (cromatografia de filtração em gel), carga elétrica (cromatografia de troca iônica), bioespecificidade (cromatografia por

afinidade) e hidrofobicidade (cromatografia de interação hidrofóbica - HIC) (QUEIROZ; TOMAZ; CABRAL, 2001).

1.4 MATERIAL E MÉTODOS

1.4.1 Extração de DNA total

Foi realizada a extração de DNA de uma linhagem de *Staphylococcus xylosus* (ATCC 29971) obtida da Fundação André Tosello (Campinas –SP) e de três linhagens de *Staphylococcus xylosus*, isoladas a partir de lingüiça colonial produzida no Rio Grande do Sul (FIORENTINI et al., *in press*) através de protocolo de extração descrito em Khaled et al. (1997), com modificações (ANEXO A)

O rendimento e grau de pureza dos DNAs extraídos foram estimados através da leitura da densidade ótica (D.O.) nos comprimentos de onda 260 nm e 280 nm em espectrofotômetro (Hitachi modelo U1800).

1.4.2 Amplificação do gene de lipase de *Staphylococcus xylosus*

Um fragmento (1158pb) do gene da lipase de *S. xylosus* foi amplificado utilizando os iniciadores específicos LIP (Invitrogen Brazil Ltda) desenhados a partir da sequência de lipase (AF208229).

LIP1 5'-GCTGCAAACAAGGACAGTATAA- 3'

LIP2 5'-TAAGCATCAAATTGCTCGTTACGA-3'

As reações de amplificação foram padronizadas em um volume final de 25 µL contendo tampão de PCR (20 mM Tris-HCl, pH 8,4, 50 mM KCl), 2 mM MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 500 nM de cada iniciador, 1 unidade de Taq DNA polimerase e 50 ng de DNA molde.

As amplificações foram executadas em um Minicycler™ (MJ Research, Inc. Watertown, MA) com o seguinte programa: desnaturação a 95 °C por 5 minutos seguido de 40 ciclos de 95 °C por 60 segundos, 50 °C por 60 segundos, e 72 °C por 90 segundos; extensão final a 72 °C por 7 minutos, modificado a partir de Morot-Bizot; Talon; Leroy-Setrin (2003).

O DNA, após amplificação, foi analisado através da eletroforese com uma corrente de 400 mA e 80 V por 50 minutos em gel de agarose (1,2%), comparando com padrão de número de pares de base de 1 Kb (Invitrogen ou Promega);

evidenciado com brometo de etídio na concentração de 0,2 µg/mL. Após a eletroforese os géis foram analisados sob luz ultravioleta UV (254 nm) e as imagens digitalizadas utilizando câmera fotográfica CANON Powershot A70.

1.4.3 Construção do pGEMSYX e pGEMS4

Para inserir o fragmento de DNA correspondente a região codante da lipase madura de *S. xylosus* em um plasmídeo pET14b (Novagen), o produto da PCR obtido a partir dos iniciadores LIP1 e LIP2 foi re-amplificado utilizando os iniciadores LIPET para introduzir os sítios de restrição para *Xho*I e *Bam*HI (indicado em negrito). As condições da PCR utilizada foram iguais as descritas para as reações com os iniciadores LIP1 e LIP2.

LIPET1 5'-TT**CTCGAG**CAAGGACAGTATAAAAACC-3'

LIPET2 5'-TT**ACGGAT**CCTCAGTAGGATGATT-3'

Os fragmentos resultantes da reação de PCR, com tamanho esperado de 1085pb, foram purificados através da utilização de kit Concert Rapid PCR (Gibco BRL) e clonados em plasmídeo pGEM-T Easy (Promega), resultando em plasmídeos recombinantes pGEMSYX e pGEMS4 correspondente a lipase de referência e a linhagem selvagem, respectivamente. Esses plasmídeos foram utilizados na transformação de células competentes de *E. coli* DH5α. Os transformados positivos, com o gene de lipase, foram utilizados para o seqüenciamento e construção vetor de expressão.

1.4.4 Sequenciamento de nucleotídeos e análise da sequência

O sequenciamento do inserto contido nos plasmídeos pGEMSYX (gene clonado a partir da linhagem ATCC 29971) e pGEMS4 (gene clonado a partir da linhagem isolada de lingüiça colonial, Fiorentini et al., *in press*) foram realizados no Centro de Biotecnologia da UFRGS–Porto Alegre-RS no equipamento MegaBace1000 (Amersham Biosciences, Piscataway). A comparação das sequências de lipases obtidas (Sxy e S4) com a lipase AF208229 DSM 20266 (ROSENSTEIN; GÖTZ, 2000) foi realizada através do Programa *Blast* e o alinhamento múltiplo através do *Clustal X* (versão 2.0.9).

1.4.5 Construção do vetor de expressão - pET14b_lip

Os plasmídeos pGEMSXY e pGEMS4 foram clivados com *XhoI/SalI* e os fragmentos inseridos no plasmídeo pET14b clivado com *XhoI* e defosforilado, resultando nos plasmídios recombinantes pET14b_lip1 e pET14b_lip2, sendo a cepa *E. coli* BL21 (DE3) pLysS utilizada para a superexpressão da lipase recombinante com cauda de histidina. A confirmação da inserção em fase, do gene de lipase madura, no pET14b foi realizada através da digestão enzimática utilizando *EcoRI*. Foi escolhido o plasmídeo recombinante pET14b_lip2 (lipase selvagem) para realizar a expressão da lipase com cauda de histidina.

1.4.6 Expressão e purificação de lipase

O pET14b_lip2 foi utilizado para transformar linhagens de *E. coli* BL21(DE3) pLysS para serem submetidas a testes de expressão. Foi inoculado uma colônia transformada (choque térmico) em 10 mL de caldo LB (*Luria Bertani*) suplementado com 100 µg/mL de ampicilina e 50 µg/mL de cloranfenicol e incubados a 37 °C por 12 a 15 horas. As culturas foram inoculadas em 250 mL de caldo LB e incubados a 37 °C até atingirem uma DO₆₀₀ de 0,8. Foi adicionado 1 mM (concentração final) de isopropil b-D-tiogalactopiranosida (IPTG), a indução aconteceu em temperaturas de 30 °C por 5 horas. Após a indução, células foram recolhidas por centrifugação (4 °C, 3000 g, 15 min.) e o precipitado celular foi lavado com fosfato de sódio (50 mM, pH 8,0). As células foram ressuspendido em de tampão de ligação (50 mM fosfato, 300 mM NaCl, 10 mM imidazol, pH 8,0) e PMSF (concentração final 1 mM) e então foi realizada a lise celular em desmembrador sônico Fischer 100 (7 ciclos a 10 W por 20 s com 30 s de intervalo). O lisado foi então centrifugado (4 °C, 10.000 g, 20 min.) para separação do sobrenadante, contendo as proteínas solúveis. O extrato bruto contendo a lipase recombinante foi injetado na coluna Ni-NTA (QIAGEN) previamente equilibrada com o tampão de ligação e purificada de acordo com as orientações do fabricante. A lipase recombinante foi eluída com 5 mL de tampão de eluição (50 mM fosfato, 300 mM NaCl, 250 mM imidazol, pH 8,0) e coletadas frações de 0,5 mL. Pureza e massa molecular aparente foram determinadas por eletroforese SDS-PAGE em géis contendo 10% de

poliacrilamida de acordo com o protocolo (LAEMMLI, 1970) utilizando sistema Bio-Rad Mini-PROTEAN[®]. A concentração de proteína foi determinada utilizando sistema Bio-Rad utilizando BSA como padrão.

1.4.7 Determinação da massa molecular da lipase recombinante na forma nativa por filtração em gel

A massa molecular aproximada da lipase nativa foi estimada por filtração em gel (Superdex 200 Prep Grade - GE Healthcare) conectado a um sistema ÄKTA (GE Healthcare). A coluna foi equilibrada com tampão Tris 20 mM (pH 8,0) contendo 500 mM NaCl, 5 mM DTT, 10% de glicerol e calibradas com: tireoglobulina, 669 kDa; apoferritin, 443 kDa; AN, 200 kDa; álcool desidrogenase, 150 kDa; BSA, 66 kDa; anidrase carbônica, 29 kDa (VERNAL et al., 2007). A proteína selvagem foi eluída com o mesmo tampão.

1.4.8 Determinação da atividade de lipase recombinante da linhagem selvagem S4

A atividade enzimática foi determinada através de espectrofotometria de acordo com van Kampen et al. (2001) utilizando *p*-nitrofenil butirato (pNPC4) e *p*-nitrofenil palmitato (pNPC₁₆) como substratos, ambos da marca Sigma. A liberação de *p*-nitrofenol foi continuamente monitorada a 400 nm (espectrofotômetro HITACHI U2010) por 5 min a temperatura ambiente. Para realizar a reação, uma solução estoque de 20 mM e 100 mM de pNPC4 e pNPC16, respectivamente, foi preparada em isopropanol. A solução de reação consistiu de 135 μ L da solução estoque em 10 mM de CaCl₂ e 50 mM Tris-HCl pH 8,0 diluídos em um volume final de 2,95 mL de isopropanol. Em seguida, foram adicionados 50 μ L de lipase recombinante purificada para cada amostra. O coeficiente de absorvidade molar para o *p*-nitrofenol utilizado foi de 16,888 M⁻¹cm⁻¹ (VAN KAMPEN *et al.*, 2001). Uma unidade de lipase foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μ mol de *p*-nitrofenil por minuto.

1.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir de três cepas de *Staphylococcus xylosus* (Q3, R1 e S4) isoladas de lingüiça colonial (FIORENTINI et al., *in press*), e da linhagem padrão *Staphylococcus xylosus* ATCC 29971 (SXY) foi realizada a extração de DNA e o fragmento do gene da lipase (AF208229) foi amplificado utilizando iniciadores designados como LIP1/LIP2 (Figura 3). Para inserir o fragmento de DNA correspondente a região codante da lipase madura de *S.xylosus* em um plasmídeo pET, o produto da PCR foi amplificado utilizando os iniciadores LIPET para introduzir os sítios de restrição para *Xho*I e *Bam*HI nos fragmentos do gene da lipase (Figura 4).

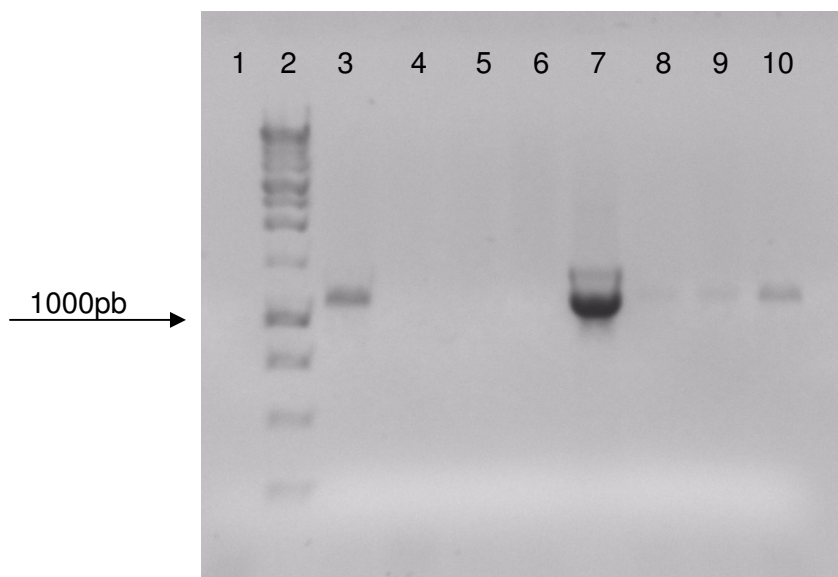


Figura 3 – Amplificação com iniciadores LIP1 E LIP2 de DNA de *S. xylosus*

1 Controle negativo, água; 2 Padrão de pares de base de 1 Kb; 3 Controle positivo, *S. xylosus* ATCC 29971; 4 Linhagem Q3; 5 Linhagem R1; 6 Linhagem S4; 7 a 10 repetição das canaletas 3, 4, 5 e 6 respectivamente, com maior concentração de DNA

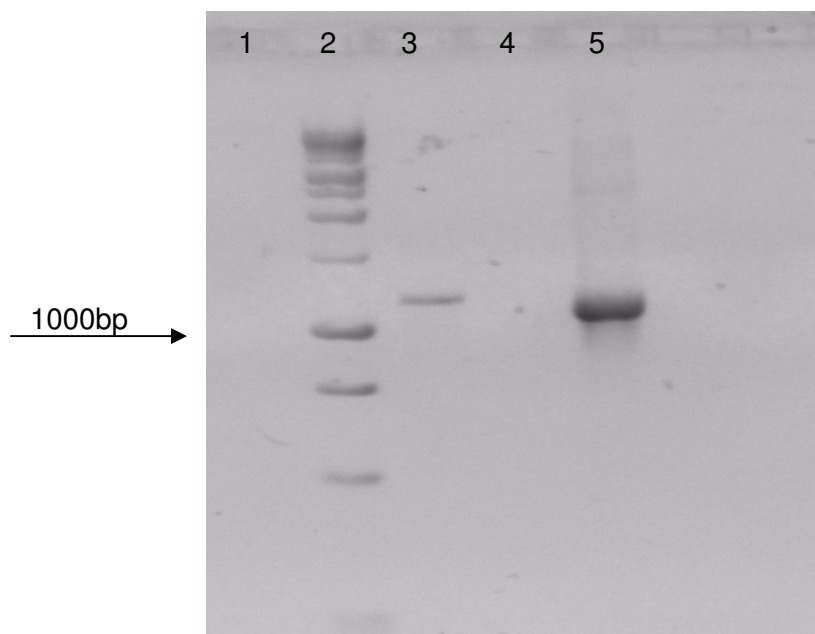


Figura 4 – Amplificação com iniciadores LIP1/LIP2 e LIPET1/LIPET2 de DNA de *S. xylosus*

1 Controle negativo, água; 2 Padrão de pares de base de 1 Kb; 3 Controle positivo, ATCC 29971 com iniciadores lip; 4 sem amostra ; 5 Controle positivo, ATCC 29971 com iniciadores lipet

Um fragmento de 1158 pb foi amplificado utilizando o DNA genômico da linhagem *S. xylosus* ATCC 29971, (SXY) e DNA da linhagem de *S. xylosus* isolada de lingüiça colonial, S4 (selvagem). Este fragmento de 1158 pb corresponde à região codificadora da lipase madura (ROSENSTEIN; GÖTZ, 2000), incluindo os sítios de restrição adicionados.

Os produtos da PCR correspondentes a região do gene que codifica a lipase madura SXY e S4 foram clonados e seqüenciados, revelando 1085 pb de nucleotídeos em cada seqüência (Anexos B e C). A seqüência de polipetídeos traduzidos, correspondentes a parte madura da proteína, compreende 361 aminoácidos (Figura 5) com a massa molecular calculada em 40,75 kDa para a lipase SXY e 40,95 kDa para a lipase S4. As seqüências obtidas (SXY e S4) apresentaram homologia de 99% com o gene de lipase de *S.xylosus* AF208229 isolada da linhagem DSM 20266 (ROSENSTEIN; GÖTZ, 2000).

A comparação das seqüências de aminoácidos das lipases S4 (linhagem selvagem) e AF208229 (linhagem DSM 20266) revelou que apenas os resíduos lisina (46) e a Glicina (361) são diferentes. Quando lipase AF208229 foi comparada com a lipase de ATCC 29971, foram encontradas diferenças nos resíduos 59, 136, 137, 162, 220, 223, 243, 357 e 361.

```

      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      10          20          30          40          50
AF208229  QGQYKNQDPI ILVHGFNGFT DDINPAVLAH YWGGDKLNIR QDLESNGYET
S4        QGQYKNQDPI ILVHGFNGFT DDINPAVLAH YWGGDKLNIR QDLESKGYET
SXY      QGQYKNQDPI ILVHGFNGFT DDINPAVLAH YWGGDKLNIR QDLESNGYET
Consenso *****
      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      60          70          80          90         100
AF208229  YEASVGALSS NYDRAVELYY YIKGGTVDYG AAHAEKYGHE RYKTYEGVY
S4        YEASVGALSS NYDRAVELYY YIKGGTVDYG AAHAEKYGHE RYKTYEGVY
SXY      YEASVGALSS NYDRAVELYY YIKGGTVDYG AAHAEKYGHE RYKTYEGVY
Consenso *****
      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      110         120         130         140         150
AF208229  KDWQPGKVVH LVAHSMGGQT VRQLEELLRN GNQEIEYQK EHGGEISPLF
S4        KDWQPGKVVH LVAHSMGGQT VRQLEELLRN GNQEIEYQK EHGGEISPLF
SXY      KDWQPGKVVH LVAHSMGGQT VRQLEELLRN GNQEELGYQK EHGGEISPLF
Consenso *****
      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      160         170         180         190         200
AF208229  QGNNNDMVNS ITTIGTPHNG THAADALGNE AIVRQLAFDY AKFKGNKNSK
S4        QGNNNDMVNS ITTIGTPHNG THAADALGNE AIVRQLAFDY AKFKGNKNSK
SXY      QGNNNDMVNS IATIGTPHNG THAADALGNE AIVRQLAFDY AKFKGNKNSK
Consenso *****
      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      210         220         230         240         250
AF208229  VDFGFGQWGL KQREGETYAQ YVQRVQNSGL WKTEDNGFYD LTREGAAKLN
S4        VDFGFGQWGL KQREGETYAQ YVQRVQNSGL WKTEDNGFYD LTREGAAKLN
SXY      VDFGFGQWGL KQREGETYAP YVHRVQNSGL WKTEDNGFYD LAREGAAKLN
Consenso *****
      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      260         270         280         290         300
AF208229  KNTSLNPNIV YKTYTGESTR PTLFGNQKSD VNLFLPFTVT GNVIGKAAEK
S4        KNTSLNPNIV YKTYTGESTR PTLFGNQKSD VNLFLPFTVT GNVIGKAAEK
SXY      KNTSLNPNIV YKTYTGESTR PTLFGNQKSD VNLFLPFTVT GNVIGKAAEK
Consenso *****
      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      310         320         330         340         350
AF208229  EWRENDGLVS TISSQHFPNQ AFIEATDEVK KGVWQVTPIK HGWDHVDVFG
S4        EWRENDGLVS TISSQHFPNQ AFIEATDEVK KGVWQVTPIK HGWDHVDVFG
SXY      EWRENDGLVS TISSQHFPNQ AFIEATDEVK KGVWQVTPIK HGWDHVDVFG
Consenso *****
      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      360
AF208229  QDSTDSNHPT E
S4        QDSTDSNHPT G
SXY      QDSTDSIHPT G
Consenso *****

```

Figura 5 - Alinhamento da seqüência de aminoácidos parte madura da lipase das linhagens Sxy (ATCC) e S4 (selvagem) com a seqüência AF208229

São indicados em negrito os aminoácidos SER, ASP e HIS que formam a tríade catalítica. O alinhamento múltiplo foi realizado através do programa CLUSTAL X (versão 2.0.9)

A atividade das lipases é dependente de um sistema de substituição de carga que envolve a tríade ativa Ser-Asp/Glu-His, chamada tríade catalítica (JAEGER et al., 1999). Além disso, o resíduo ativo de serina é comumente encontrada no sequência altamente conservada Gly(Ala)-X-Ser-X-Gly (JAEGER et al., 1999). Apesar das diferenças indicadas, a tríade catalítica formado por Ser-Asp-His foi encontrada nos resíduos 115, 308 e 347, respectivamente. Nucleófilo Ser-115 foi encontrado na seqüência Ala-113, His-114, Ser-115, Met-116, Gly-117, que formam a seqüência consenso Gly(Ala)-X-Ser-X-Gly, apesar do primeiro resíduo Gly ser um resíduo na lipase de *S. xylosus*.

Mosbah et al. (2005) clonaram e expressaram a lipase AF701336 da linhagem *S. xylosus* que apresentou a completa seqüência consenso Gly(Ala)-X-Ser-X-Gly.

1.5.1 Construção do vetor de expressão - pET14b_lip

Para realizar a expressão da lipase, os fragmentos correspondentes a região madura da lipase foram clivados *Sall/XhoI* dos plasmídios pGEMSxy e pGEMS4 e inseridos em fase no sítio *XhoI* do plasmídio pET para expressar em *E.coli* as proteínas-fusão lipase contendo a cauda de histidina N-terminal. A proteína de fusão deduzida com cauda N-terminal de histidina inicia com: MGGSHHHHHSSGLVPAGSHMLEQQQYKNQD, na qual Q24 corresponde a Q2 da forma madura da lipase de *S. xylosus* e termina com DSNHPTEDP*, na qual E corresponde ao E362 da lipase madura. Os plasmídeos recombinantes resultantes foram denominados de pET_lip1 e pET_lip2.

1.5.2 Expressão e purificação de lipase

Apenas o plasmídeo pET_lip2 (lipase selvagem) foi introduzido em cepas *E. coli* BL21 (DE3) para expressar a lipase recombinante. Diferentes condições foram testadas para expressão da lipase, sendo que a melhor expressão ocorreu na temperatura de 30 °C por 5 h com 1 mM isopropil β-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG), o que foi confirmado por uma banda de aproximadamente 37 kDa na análise de SDS-PAGE (Figura 6). Lipase recombinante foi então purificada através de uma coluna de

afinidade de níquel, a partir de um homogeneizado células lisadas. A proteína-fusão ligada a resina foi eluída com 250 mM de imidazol.

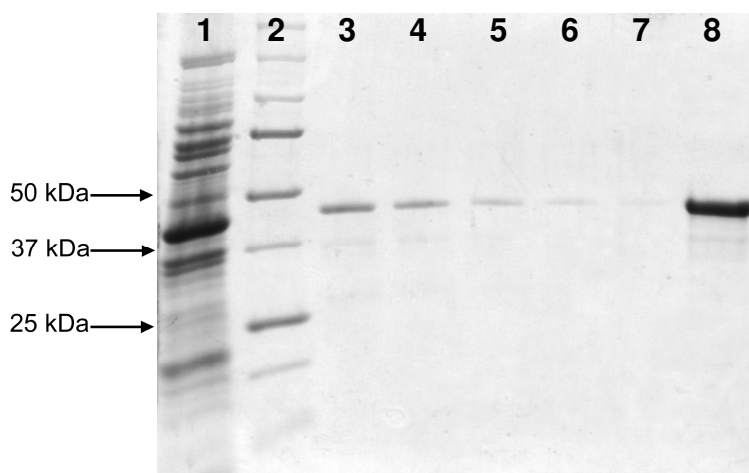


Figura 6 - SDS-PAGE de lipase recombinante de linhagem selvagem S4 de *S.xylosus* purificada em coluna de Ni-NTA

Canaleta 1: extrato bruto; Canaleta 2: marcador de pares de base; Canaleta 3: eluato 6; Canaleta 4: eluato 7; Canaleta 5: eluato 8; Canaleta 6: eluato 9; Canaleta 7: eluato 7; Canaleta 8: lipase após a filtração em gel.

1.5.3 Determinação da massa molecular por filtração em gel da lipase recombinante em forma nativa

A mobilidade eletroforética da lipase selvagem foi coerente com a massa molecular obtida teoricamente (42,8 kDa), prevista para todo o comprimento da proteína recombinante. O estado monomérico da lipase selvagem foi determinado através da comparação de seu perfil de eluição na coluna filtração em gel com outras proteínas (Figura 7). O resultado mostra que a lipase selvagem elui em 84,4 mL, entre o volume de eluição anidrase carbônica (89,7 mL, 29 kDa) e BSA (75,6 mL, 66 kDa). Este resultado sugere que a lipase recombinante da linhagem selvagem nativa é um monômero de 38,5 kDa.

A lipase de *S. xylosus* isolada por Mosbah et al. (2005) é uma proteína monomérica de 45 kDa. Ao contrário de outras lipases estafilocócicas descritas previamente, que apresentaram propriedades de formar agregados sob condições

nativas, estas duas lipases de *S. xylosus* apresentaram-se como proteínas monoméricas.

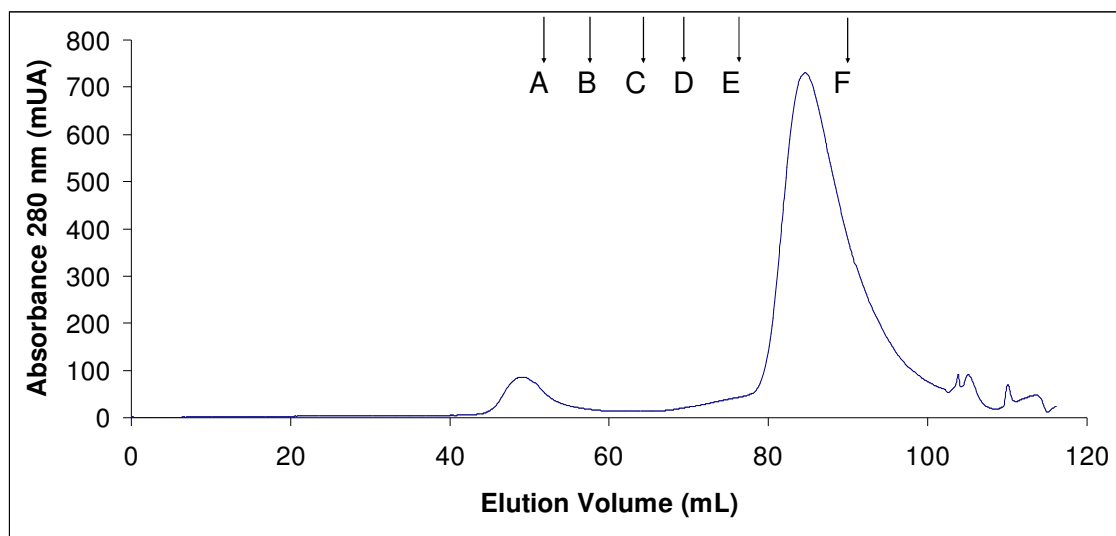


Figura 7- Cromatografia de filtração em gel da lipase de *S. xylosus* (Superdex 200 Prep Grade)

Marcadores moleculares são indicados pelas setas (A – F). (A) tireoglobulina (51,13 mL, 669 kDa); (B) apoferritin (56,97mL, 443 kDa); (C) β -amilase (63,67mL, 200 kDa); (D) álcool desidrogenase (68,98mL, 150 kDa); (E) BSA (75,65 mL, 66 kDa); (F) anidrase carbônica (89,50 mL, 29 kDa). Volume de eluição de lipase nativa de *S. xylosus* foi de 84,4 mL

1.5.4 Determinação da atividade da lipase recombinante da linhagem selvagem S4

A atividade específica da lipase selvagem foi determinada de acordo com van Kampen et al. (2001) pelo monitoramento em 400 nm da produção de p-nitrofenol a partir da hidrólise de pNPC₄ e pNPC₁₆. A linhagem da lipase selvagem apresentou alta atividade específica para ambos substratos, entretanto para a atividade pNPC₁₆, a atividade foi maior do que para pNPC₄ (Tabela 3).

A lipase de *S. xylosus* apresentada por Mosbah et al. (2005), purificadas a partir do sobrenadante da cultura apresentaram atividades específicas de 1900 U / mg usando tributirina e óleo de oliva como substratos. Esta lipase, foi clonada e expressada em *E. coli* BL21 (DE3) com pET-14b, como vetor expressão (MOSBAH et

al., 2006). A lipase recombinante mostrou atividades específicas de 1500 U/mg e 850 U/mg, usando tributirina e óleo de oliva como substratos, respectivamente.

Algumas lipases estafilocócica, como por exemplo *S. epidermidis* (SEL3), *S. haemolyticus* (ShaL), *S. aureus* (SAL1) hidrolisam preferencialmente substratos de cadeia curta, solúveis em água (ROSENSTEIN e GÖTZ, 2000; VAN KAMPEN et al., 2001). Entretanto, a lipase de *S. xylosus* apresentada neste trabalho parece preferir substratos de cadeia longa. Isto pode ser devido ao fato de esta lipase ter sido isolada a partir de uma linhagem isolada de uma linguiça fermentada naturalmente, onde predominam lipídios com ácidos graxos de cadeia longa (BAGGIO; BRAGAGNOLO, 2008; BIANCHI et al., 2007; DI CAGNO et al., 2007; VISESSANGUAN et al., 2006).

Tabela 3 - Atividade específica da lipase de *S. xylosus* utilizando pNPC4 e pNPC16 como substratos

Eluatos	Concentração da proteína ($\mu\text{g/mL}$)	Atividade específica (U/mg)	
		pNPC ₄	pNPC ₁₆
1	258,4	34	174
2	325,1	32	185
8	41,7	559	2.829
9	35,1	539	2.936
10	32,8	555	3.419

Atividade específica foi determinada pelo acompanhamento da liberação de p-nitrofenol em 400 nm de acordo com van Kampen et al. (2001). Os valores são uma média de 3 medidas.

A modificação de óleo e gorduras é uma das áreas mais promissoras na indústria de alimentos. Óleos de interesse nutricional, com triglicerídeos estruturados intencionalmente, têm um grande potencial no processamento de alimentos (PIRES-CABRAL E FERREIRA-DIAS, 2008). Lipases bacterianas com características de especificidade podem ser utilizadas para modificar óleos e gorduras intencionalmente, desde que as modificações enzimáticas sejam específicas e possam ser realizadas em condições moderadas de reação (Hasan e Hameed, 2006). A lipase selvagem de *S. xylosus* pode ser útil na modificação de lipídios com ácidos graxos de cadeia longa.

1.6 CONCLUSÕES

No presente estudo os genes que codificam lipases de *S. xylosus* (Sxy e S4) foram clonados em *E. coli* DH5 α e a proteína-fusão (lipase selvagem - S4) foi expressa em *E. coli* BL21 (DE3) pLysS, com sucesso.

A caracterização molecular dos genes mostrou que as seqüências de aminoácidos obtidas a partir das linhagens de *S. xylosus* (Sxy e S4), apresentam homologia de 99% quando comparados com o gene de lipase de *S. xylosus* AF208229.

O seqüenciamento dos genes também revelou que a tríade catalítica composta de Ser-Asp/Glu-His apresenta-se conservada nas linhagens estudadas.

A proteína-fusão purificada em resina Ni-NTA apresentou alta atividade específica para p-nitrofenilbutirato (pNPC₄) e p-nitrofenilpalmitato (pNPC₁₆), sendo aparentemente mais ativa em substrato de cadeia longa (C₁₆) podendo ser utilizada na modificação de óleos e gorduras, área de grande potencial no processamento de alimentos.

1.7 REFERÊNCIAS

- ABOLA, E.; KUHN P.; EARNEST, T.; STEVENS, R. C. Automation of X-ray crystallography. **Nature Structural Biology**, Structural Genomics Supplement, v. 973, 2000.
- ARNAU, J.; LAURITZEN, C; PETERSEN, G. E.; PEDERSEN, J. Current strategies for the use of aYnity tags and tag removal for the purification of recombinant proteins. **Protein Expression and Purification**, v. 48, p. 1–13, 2006.
- BAGGIO, S. R. BRAGAGNOLO, N. Lipid fraction quality evaluation of Brazilian meat-based products. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 19, p. 463-470, 2008.
- BIANCHI, F.; CANTONI, C.; CARERI, M.; CHIESA, L.; MUSCI, M. PINNA, A. Characterization of the aromatic profile for the authentication and differentiation of typical Italian dry-sausages. **Talanta**, v. 72, p. 1552-1563, 2007.
- CASTRO, H. F. de; MENDES, A. A.; SANTOS, J. dos. Modificações de óleos e gorduras por biotransformação. **Química Nova**, v. 27, p. 146-156, 2004.
- CHAKRABORTY, K.; RAJ, R. P. An extra-cellular alkaline metallolipase from *Bacillus licheniformis* MTCC 6824: purification and biochemical characterization. **Food Chemistry**, v. 109, p. 727-736, 2008
- DI CAGNO, R.; LÒPEZ, C. C.; TOFALO, R.; GALLO, G.; DE ANGELIS, M.; PARAPPELLA, A.; HAMMES, W.P.; GOBETTI, M. Comparison of the compositional, microbiological, biochemical and volatile profile characteristics of three Italian PDO fermented sausages. **Meat Science**, v. 79, p. 224-235, 2007.
- DROSINOS, E. H.; MATARAGAS, M.; XIRAPHI N.; MOSCHONAS G.; GAITIS F.; METAXOPOULOS, J. Characterization of the microbial flora from a traditional Greek fermented sausage. **Meat Science**, n. 69, p. 307–317, 2005.
- FERNÁNDEZ L.; PÉREZ-VICTORIA, I.; ZAFRA, A.; BENÍTEZ, P. L.; MORALES, J. C.; VELASCO, J.; ADRIO, J. L. High-level expression and characterization of *Galactomyces geotrichum* (BT107) lipase I in *Pichia pastoris*. **Protein Expression and Purification**, v. 49, p. 256–264, 2006.
- FIORENTINI, A. M. **Caracterização e propriedade tecnológicas de *Staphylococcus xylosus* isoladas de salames artesanais e aplicação como cultura iniciadora em salame tipo Milano**. 2008, 113p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos), Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

- FIORENTINI, A. M.; SAWITZKI, M. C.; BERTOL, T. M.; BROD, F. C. A.; PELISSER, M. R.; ARISI, A. C. M.; SANT'ANNA, E. S. Phenotypic and molecular characterization of *Staphylococcus xylosus*: Technological potential for use in fermented sausage. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 2007 *in press*.
- FRIKHA, F.; LADJIMI, M.; GARGOURI, Y.; MILED, N. 3-D structure modelling of the *Staphylococcus simulans* lipase: conformational changes, substrate specificity and novel structural features. **FEMS Microbiology Letters**, n. 286, p. 207–221, 2008.
- GUPTA, R.; GUPTA, N.; RATHI, P. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. **Applied Microbiology & Biotechnology**, v. 64, p. 763-781, 2004.
- HABA, E.; BRESCO, O.; FERRER, C.; MARQUÉS, A.; BUSQUETS, M.; MANRESA, A. Isolation of lipase-secreting bacteria by deploying used frying oil as selective substrate. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, p. 40-44, 2000.
- HASAN, F.; SHAH, A.A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and microbial technology**, v. 39, p. 235-251, 2006.
- IACUMIN, L.; COCOLIN, L.; CANTONI, C.; COMI, G. Preliminary analysis of the lipase gene (gehM) expression of *Staphylococcus xylosus* in vitro and during fermentation of naturally fermented sausages (in situ). **Journal of Food Protection**, v. 70, p. 2665-2669, 2007.
- JAEGER, K-E.; DIJKSTRA, B. W.; REETZ, M. T. Bacterial Biocatalysts: Molecular Biology, Three-Dimensional Structures, and Biotechnological Applications of Lipases, **Annual Review of Microbiology**, v. 53, p. 315–351, 1999.
- JAEGER, K-E.; REETZ, M. T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology : review article. **Trends in Biotechnology**, v. 16, n. 9, p. 396-403, 1998.
- KATO, K.; ONO, M.; AKITA, H. New total synthesis of (±)-, (-)- and (+)-chuangxinmycin. **Tetrahedron**, v. 57, p. 10055-10062, 2001.
- KHALED, D. A. K.; NEILAN, B. A.; HENRIKSSON, A.; CONWAY, P.L. Identification and phylogenetic analysis of *Lactobacillus* using multiplex RAPD-PCR. **FEMS Microbiology Letters**, v. 153, p. 191-197, 1997.
- KIRK, O.; BORCHERT T.V.; FUGLSANG C.C. Industrial Enzymes applications. **Current Opinion Biotechnology**, v. 13, p. 345–351, 2002.
- KOUKER, G.; JAEGER, K. Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, p. 211-213, 1987.
- KOZACINSKI, L.; DROSINOS, E.; ČAKLOVICA, F.; COCOLIN, F.; GASPARIK-REICHARDT, J.; VESKOVIC, S. Investigation of microbial association of traditionally fermented sausages. **Food Technology and Biotechnology**, v. 46, p. 93-108, 2008.

- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.
- LEE, L. C.; CHEN, Y. T.; YEN, C. C.; CHING-YN, T.; TANG, C. S.; LEE, G. C.; SHAW, J. Altering the Substrate Specificity of *Candida rugosa* LIP4 by Engineering the Substrate-Binding Sites **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 55, p. 5103-5110, 2007.
- LORENZO, M. D.; HIDALGO, A.; MICHAEL HAAS, M.; BORNSCHEUER, U. Heterologous Production of Functional Forms of *Rhizopus oryzae* Lipase in *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, n.12, p. 8974–8977, 2005.
- MACIEL, G. R.; VERNAL, J.; PORTUGAL, R. V.; CALGARO, M.; FERNADEZ, P.; ZAKIN, M. M.; POLIKARPOV, I.; TEREZI, H. Expression, Purification and Initial Structural Characterization of Rat Orphan Nuclear Receptor NOR -1 LBD Domain. **Protein Expression Purification**, v.37, p. 443-449, 2004.
- MARTÍN, B.; GARRIGA, M.; HUGAS, M.; BOVER-CID, S.; VECIANA-NOGUÉS, M.T.; AYMERICH, T. Molecular, technological and safety characterization of Gram-positive catalase-positive cocci from slightly fermented sausages. **International Journal Food Microbiology**, v. 107, n.2, p.148-158, 2005.
- MONTEL, M. C. Biochemical activities of Micrococcaceae and their effects on the aromatic profiles and odours of dry sausages model. **Food Microbiology**, v. 13, p. 489-499, 1996.
- MOROT-BIZOT, S.; TALON, R.; LEROY-SETRIN, S. Development of specific PCR primers for a rapid and accurate identification of *Staphylococcus xylosus*, a species used in food fermentation. **Journal of Microbiological Methods**, v. 55 p. 279– 286, 2003.
- MOSBAH, H.; SAYARI A.; MEJDOUB H.; DHOUIB H.; GARGOURI Y. Biochemical and molecular characterization of *Staphylococcus xylosus* lipase. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1723, p. 282– 291, 2005.
- MOSBAH, H.; SAYARI, A.; BEZZINE, S. GARGOURI, Y. Expression, purification, and characterization of His-tagged *Staphylococcus xylosus* lipase wild-type and its mutant Asp 290 Ala. **Protein Expression and Purification**, v. 47, p. 516–523, 2006.
- OLEMPKA-BEER, Z. S.; MERKER, R. I.; DITTO, M. D.; DINOVI, M. J. Food-processing enzymes from recombinant microorganisms: a review. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 45, p. 144–158, 2006.
- PANDEY, A.; BENJAMIM, S.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; KRIEGER, N.; SOCCOL, V. T. The realm of microbial lipases in biotechnology. **Biotechnology Applied Biochemistry**, v. 29, p.119-131, 1999.
- PAQUES, F. W.; MACEDO, G. A. Lipases de látex vegetais: propriedades e aplicações industriais. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 93-99, 2006.

- PASTORE, G. M.; COSTA, V. S. R. da; KOBLITZ, M. G. B. Purificação parcial e caracterização bioquímica de lipase extracelular produzida por nova linhagem de *Rhizopus* sp. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 32, n. 2, p.135-140, 2003.
- PIRES-CABRAL, P., NUNES. P. A., FERREIRA-DIAS, S. Synthesis of low caloric structured lipids by lipase-catalysed interesterification of olive oil with caprylic acid. **Journal of Biotechnology**, v. 136, S736, 2008.
- QUEIROZ, J. A.; TOMAZ, C. T.; CABRAL, J. M. S. Hydrophobic interaction chromatography of proteins. **Journal Biotechnology**, v. 87, p.143-159, 2001.
- RANTSIOU K.; IACUMIN L.; CANTONI C.; COMI G.; COCOLIN L. Ecology and characterization by molecular methods of *Staphylococcus* species isolated from fresh sausages. **International Journal of Food Microbiology**, n.97, p. 277– 284, 2005.
- ROSENSTEIN R.; GÖTZ F. Staphylococcal lipases: biochemical and molecular characterization. **Biochimie**, v. 82, p.1005–1014, 2000.
- ROUSTAN, J.L., CHU, A.R., MOULIN, G., BIGEY, F. A novel lipase/acyltransferase from the yeast *Candida albicans*: expression and characterization of the recombinant enzyme. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 68, p.203-212, 2005.
- SAXENA, R. K., GHOSH, P. K., GUPTA, R., DAVIDSON, W.S., BRADDOO, S., GULATI, R. Microbial lipases: potential biocatalysts for the future industry. **Current Science**, v. 77, 1999.
- SAYARI, A.; MOSBAH, H.; VERGER, R.; GARGOURI, Y. The N-terminal His-tag affects the enantioselectivity of staphylococcal lipases: A monolayer study. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 313, p. 261–267, 2007.
- SECUNDO, F.; CARREA, G.; TARABIONO, C.; GATTI-LAFRANCONI, P.; BROCCA, S.; LOTTI, M.; JAEGER, K.; PULS, M.; EGGERT, T. The lid is a structural and functional determinant of lipase activity and selectivity. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 39, p. 166-170, 2006.
- SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Production, purification, characterization and applications of lipases. **Biotechnology Advances** v.19, p. 627-662, 2001.
- SIMONOVÁ, M.; STROMPFOVÁ, V.; MARCINÁKOVÁ, M.; LAUKOVÁ, A.; VESTERLUND, S.; LATORRE-MORATALLA, M.; BOVER-CID, S.; VIDAL-CAROU, C. Characterization of *Staphylococcus xylosus* and *Staphylococcus carnosus* isolated from Slovak meat products. **Meat Science**, v. 73, p. 559-564, 2006.
- TALON, R. ; WALTER, D. ; CHARITER, S. ; BARRIÈRE, C. ; MONTEL, M.C. Effect of nitrate and incubation conditions on the production of catalase and nitrate reductase by staphylococci. **International Journal of Food Microbiology**, v. 52, p. 47-56 1999.

TIESINGA, J. J. W.; POUDEROYEN, G. van. ; RANSAC, M. N. S.; DIJKSTRA, B. W. Structural Basis of Phospholipase Activity of *Staphylococcus hyicus* lipase. **Journal of Molecular Biology**, n. 371, p. 447–45, 2007.

TYNDALL, J .D. A.; SINCHAIKUL, S.; FOTHERGILL-GILMORE, L. A.; TAYLOR P.; WALKINSHAW, M. D. Crystal Structure of a Thermostable Lipase from *Bacillus stearothermophilus* P1. **Journal of Molecular Biology**, n. 323, p. 859–869, 2002.

VAN KAMPEN, M.D.; ROSENSTEIN, R.; GÖTZ F.; EGMOND, M. R. Cloning, purification and characterisation of *Staphylococcus warneri* lipase 2. **Biochimica et Biophysica Acta**, n. 1544, p. 229-24, 2001.

VERNAL, J.; SERPA, V.I.; TAVARES, C.; SOUZA, E.M.; PEDROSA, F.O.; TERENCEZI, H. Expression, purification and biochemical characterization of a single-stranded DNA binding protein from *Herbaspirillum seropedicae*. **Protein Expression and Purification**, v. 53, p.195-200, 2007.

VISSANGUAN, W.; SOOTTAWAT, B.; RIEBROY, S.; YARCHAI, M.; TAPINGKAE, W. Changes in lipid composition and fatty acid profile of Nham, a Thai fermented pork sausage during fermentation. **Food Chemistry**, 580-588, 2006.

ANEXOS

A) Protocolo de extração de DNA

Segundo KHALED et al. (1997), com modificações

A partir de uma cultura de 10 mL de *Staphylococcus xylosus*, incubada por 18 horas a 35 °C, uma alíquota de 1,5 mL foi centrifugada por 10 minutos a 6000 g, o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido em 400 µL de caldo TE (10 mM Tris, pH7,6 e 1 mM EDTA). Em seguida foi adicionado 10 µL de RNase (20mg/mL) e a solução foi incubada por 30 minutos a 37 °C. Após período de incubação, foi adicionado 20 µL de solução proteinase K (20 mg/mL) e 20 µL de *Sodium Dodecyl Sulfate* - SDS a 10%. A mistura foi incubada em banho-maria a 55 °C por 30 minutos ou até haver a lise das células e clarear. A solução foi resfriada em banho de gelo e a fase aquosa foi extraída com igual volume de Fenol:Clorofórmio:Álcool isoamílico (25:24:1), seguido de duas extrações com Clorofórmio:Álcool isoamílico (24:1). Após a lavagem para retirada de interferentes e resíduos de fenol, a fase aquosa foi transferida para novo microtubo com igual volume de isopropanol à temperatura ambiente para precipitação de DNA com homogeneização e centrifugação por 5 minutos a 6.000 g; o sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 1 mL de etanol 70%. Após foi realizada a centrifugação por 2 minutos a 6.000 g. A secagem ocorreu em temperatura ambiente por aproximadamente 1 hora ou em estufa 30 °C por 20 minutos. O precipitado de DNA foi ressuspendido em 50 µL de tampão TE (10 mM TRIS10 - pH 7,6 e 1 mM EDTA) e colocado em geladeira por uma noite antes de estocar a - 20 °C.

B)Seqüência de nucleotídeos da lipase Sxy e tradução da seqüência de aminoácidos

```

caaggacagtataaaaaccaagatcctatcatttttagtgcacggtttcaatggctttact 60
Q G Q Y K N Q D P I I L V H G F N G F T 20
gatgatattaatccagcgggtattagctcattattgggtggagataaattgaaatccgc 120
D D I N P A V L A H Y W G G D K L N I R 40
caagatttagaaagtaatggttatgaaacatacgaagcagcgttggtgcattaggtagt 180
Q D L E S N G Y E T Y E A S V G A L G S 60
aactacgatcgtgccgttgagctttattactatattaagggtggcaggttagattatggt 240
N Y D R A V E L Y Y Y I K G G T V D Y G 80
gcagcccacgtgagaagtacggtcacgaacgttatggtaaaacatatgaaggtgtatat 300
A A H A E K Y G H E R Y G K T Y E G V Y 100
aaagattggcaaccaggtaaaaaagttcacttagtggctcatagtatgggtggacaaaaca 360
K D W Q P G K K V H L V A H S M G G Q T 120
gtgagacaacttgaagaattattgcgtaacggtaacgaagaactaggatatcaaaaa 420
V R Q L E E L L R N G N Q E E L G Y Q K 140
gaacatggcgggtgagatttctccactattccaaggcaataacgataatatggtgaattca 480
E H G G E I S P L F Q G N N D N M V N S 160
attgctactattggtagcctcataatggtacacatgctgcagatgcattaggtaatgag 540
I A T I G T P H N G T H A A D A L G N E 180
gcgatagttagacaattagcatttgattacgcaaattcaaaggtataaaaaactcaaaa 600
A I V R Q L A F D Y A K F K G N K N S K 200
gtagattttggttttgccagtggtcttaaacagagagaaggagaaacgtacgctcca 660
V D F G F G Q W G L K Q R E G E T Y A P 220
tacgtacaccgcttcaaaatagcggattatggaaaacagaagacaacggattttatgat 720
Y V H R V Q N S G L W K T E D N G F Y D 240
ttggctaggaagggtgctgctaaattaataaaaacacatcgtaaacctaacattgtc 780
L A R E G A A K L N K N T S L N P N I V 260
Tataaaacatacactggagaatcaacaagacactttgtttggcaatcaaaaatccgat 840
Y K T Y T G E S T R P T L F G N Q K S D 280
gttaatttgttctaccatttactgtaacgggtaatgtaattggcaaagctgcagaaaaa 900
V N L F L P F T V T G N V I G K A A E K 300
gaatggcgtgaaaatgacggcttagtcttactatttcatcacaacatccatttaataca 960
E W R E N D G L V S T I S S Q H P F N Q 320
gcctttatagaagctacggacgaagtgaaaaaggtgtatggcaagtgactccaattaa 1020
A F I E A T D E V K K G V W Q V T P I K 340
cacggttgggacctagtagattttgttggtaagatttactgactcaattcatcctact 1080
H G W D H V D F V G Q D S T D S I H P T 360
ggga 1085
E 361

```

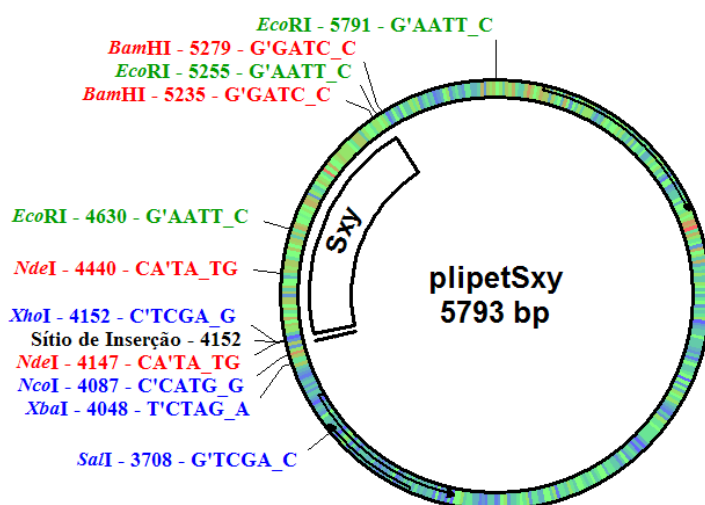
C) Sequência de nucleotídeos da lipase S4 e tradução da sequência de aminoácidos

```

caaggacagtataaaaaccaagatcctatcattttagtgcatggtttcaatggctttact 60
  Q G Q Y K N Q D P I I L V H G F N G F T 20
gatgatattaatccagcgggtattagccattattgggtggagataaattgaatatccgc 120
  D D I N P A V L A H Y W G G D K L N I R 40
caagatttagaaagtaagggttatgaaacatacgaagcgcggttggtgcattaagtagt 180
  Q D L E S K G Y E T Y E A S V G A L S S 60
aactacgatcgtgccgttgagctttattactatattaaggggtggcaggttagattatggt 240
  N Y D R A V E L Y Y Y I K G G T V D Y G 80
gcagcccattgctgagaagtacgggtcatgaacgttatggtaaaacatatgaaggtgtatat 300
  A A H A E K Y G H E R Y G K T Y E G V Y 100
aaagattggcaaccaggtaaaaaagttcacttagtggctcatagtatgggtggacaaaca 360
  K D W Q P G K K V H L V A H S M G G Q T 120
gtgagacaacttgaagaattattgctaacggtaatacaagaagaatagaatatcaaaaa 420
  V R Q L E E L L R N G N Q E E I E Y Q K 140
gaacatggcgggtgagatttctcactattccaaggcaataacgataatatggtgaattca 480
  E H G G E I S P L F Q G N N D N M V N S 160
attactactattggtacgcctcataatggtacacatgctgcagatgcattaggaatgag 540
  I T T I G T P H N G T H A A D A L G N E 180
gcgatagtttagacaattagcatttgattacgccaaattcaaaggtaataaaaaactcaaaa 600
  A I V R Q L A F D Y A K F K G N K N S K 200
gtagattttggttttgccagtggttcttaaacagagagaaggagaaacgtacgctcaa 660
  V D F G F G Q W G L K Q R E G E T Y A Q 220
tacgtacaacgcggttcaaaatagcggattatggaaaacagaagacaacggattttatgat 720
  Y V Q R V Q N S G L W K T E D N G F Y D 240
ttgactaggggaaggtgctgctaaattaataaaaacacatcgtaaacctaacattgtc 780
  L T R E G A A K L N K N T S L N P N I V 260
tataaaacatacactggagaatcaacaagacctactttgtttggaatcaaaaatccgat 840
  Y K T Y T G E S T R P T L F G N Q K S D 280
gttaatttgcttaccatttactgtaacgggtaataatgtaattggcaaagctgcagaaaaa 900
  V N L F L P F T V T G N V I G K A A E K 300
gaatggcgtgaaaatgacgggttagtctctactatttcatcacaacatccatttaatacaa 960
  E W R E N D G L V S T I S S Q H P F N Q 320
gcctttatagaagctacggacgaagtgaaaaaaggtgtatggcaagtgactccaattaaa 1020
  A F I E A T D E V K K G V W Q V T P I K 340
cacggttgggacctagtagattttgttggtcaagatttctactgactcaaatcatcctact 1080
  H G W D H V D F V G Q D S T D S N H P T 360
ggga 1085
E 361

```

D) Mapa do plasmídeo com inserto



New DNA entry, 2730 bp. (LINEAR)
 Oligonucleotide priming analysis 6/12/2005
 pDRAW32 revision 1.1.88
 Database containing 4 oligonucleotides.
 LenPr = 3' anealing length.
 MaxMM = maximum # mismatch with in LenPr
 Minimum TM set to 40 °C
 [primer] = 300 nM
 [NaCl + KCl] = 50 mM, [MgCl₂] = 1 mM
 [Glycerol] = 1 %, [Formamide] = 0 %, [DMSO] = 0 %

lip1

Tm = 56,9°C
 Length = 23, LenPr = 23, MaxMM = 1
 5'-GCTGCAAAACAAGGACAGTATAA-3'
 GCTGCAAAACAAGGACAGTATAA priming site at position 1550 forward
 Tm = 56,9°C. Tpcr = 52,6°C.

lip2

Tm = 58,6°C
 Length = 24, LenPr = 24, MaxMM = 1
 5'-TAAGCATCAAATTGCTCGTTACGA-3'
 TAAGCATCAAATTGCTCGTTACGA priming site at position 2661 revers
 Tm = 58,6°C. Tpcr = 53,1°C.

Lip1/lip2: fragmento de 1158 pb

lipet1

Tm = 47,5°C
 Length = 19, LenPr = 19, MaxMM = 5

5'-CAAGGACAGTATAAAAAACC-3'
 CAAGGACAGTATAAAAAACC priming site at position 1555 forward
 Tm = 47,5°C. Tpcr = 49,8°C.

lipet2

Tm = 49,3°C
 Length = 17, LenPr = 15, MaxMM = 1
 5'-TCCTCAGTAGGATGATT-3'
 TCCTCAGTAGGATGATT priming site at position 2605 revers
 Tm = 49,3°C. Tpcr = 50,3°C.

lipet1

5'-TTCTCGAGCAAGGACAGTATAAAAAACC-3'
 XhoI
 LENGTH = 27

lipet2

5'-TTACGGATCCTCAGTAGGATGATT-3'
 * BamHI
 Length = 24

lipet1/lipet1: Fragmento de 1101 pb

1 AAAATACATT TTGAAAAGA TAGAAATAAA TTATTTATGC TATGGTACTA

51 CTTAATTTAAA TTTATTTTAC CAGTAGTTAT CGTGTTGATA TTCATAGTGC

101 AACTTATATA GCATTAAAA TTCTCGTTCT AAACGCTGCG AGAATTTTTT

151 AATTGTGCGT AATTTAGTTG TAATCGGTTA TTGACTAGAA GTAGTTTTTT

201 TAGTAGAATC TAATTAAATT ATTTATTGAA AGTTTTTAGT TGTTAATTAT

251 AGATATTTTT TAATAATTTA CTGAAAATTC TTTTGATAAA TAAAATTTTT

301 CTCAATGAAT GTAAGCGCTT TCTTTGGGAA GGGGTGAGTG GTATGAAAGC

351 TTTTATAGGT AAATTTTTTG AACTATTACC GCGTTTTATC ATTAACTTTT

401 TCATCTAGTT TTTCCTTTTA GTTAAATTGT GTTTTAAAAA TCAAGAAAAT

451 TTAGAGGTGT TGTATATGGA GAATAAACGA AATAAGTATA GTATACGTAA
 M E N K R N K Y S I R K Frame 1

501 ATTTGCTGTC GGCCTTCTT CAATTTAAT TGGCTCGTTA TTATTTTTGA
 F A V G A S S I L I G S L L F L N Frame 1

551 ATGTAGAGAC TGTAAGGCT GCTGAAGAAA ATAATCAAAG TGAAGTGGAC
 V E T V K A A E E N N Q S E V D Frame 1

601 ACACAAGTAC AAAGTGGGAA TCATTTGGGA GATGATGAAC ATCAAATTT
 T Q V Q S G N H L G D D E H Q N L Frame 1

651 AGTGAATGAC AATACAAATA CACCGGTTAA TGATGATAAA ACACAAGTGA
 V N D N T N T P V N D D K T Q V N Frame 1

701 ATGATGAAAA AGACAATCAA GCAACTCATA CTAGCTTACA TAAAGATCAA
 D E K D N Q A T H T S L H K D Q Frame 1

751 CAAGATACGA ATACTAAAGT TAACGACTCA ACAGATAAAG TAGATCCGGA
Q D T N T K V N D S T D K V D P E Frame 1

801 ATTTAATGAA GCAGATAAAG ATAAAGAGCA AGACCAAGCA GAAGTAGATC
F N E A D K D K E Q D Q A E V D P Frame 1

851 CAGAATATAA TGCAAAAGAT AAAGCGAAAG AACAAGATCA GTCAGAAGTA
E Y N A K D K A K E Q D Q S E V Frame 1

901 GATCCAGAAT ATAATGCAAA AGATAAAGCG AAAGAACAAG ATCAGTCAGA
D P E Y N A K D K A K E Q D Q S E Frame 1

951 AGTAGATCCA GAATATAATG CAAAAGATAA AGCGAAAGAA CAAGACCAGT
V D P E Y N A K D K A K E Q D Q S Frame 1

1001 CAGAAGTAGA TCCAGAATAT AACGCAAAAG ATAAAGCGAA AGAACAAGAT
E V D P E Y N A K D K A K E Q D Frame 1

1051 CAGTCAGAAG TAGATCCAGA ATATAACGCA AAAGATAAAG CGAAAGAACA
Q S E V D P E Y N A K D K A K E Q Frame 1

1101 AGATCAGTCA GAAGTAGATC CAGAATATAA CGCAAAAGAT AAAGATAAAG
D Q S E V D P E Y N A K D K D K E Frame 1

1151 AGCAAGACCA GTCAGAAGTA GATCCGGAAT ATAACGCAAC AGATAAAGCG
Q D Q S E V D P E Y N A T D K A Frame 1

1201 AAAGAACAAG ATCAGTCAGA AGTAGATCCG GAATATAACG CAACAGATAA
K E Q D Q S E V D P E Y N A T D K Frame 1

1251 AGAACAAGAA AATCATGTAG ATCATAAAGA TGCTAATCAA AATAAAATGC
E Q E N H V D H K D A N Q N K M L Frame 1

1301 TAGAAAACAG TCAGCCCGCA TTAAATGAGC GTGTTAAAAA TGATAATAAT
E N S Q P A L N E R V K N D N N Frame 1

1351 ATAAAAGAGA GCACATCTTT CGATAAATTA CCGAATCAAA CTGCAAACCA
I K E S T S F D K L P N Q T A N H Frame 1

1401 CGATTCTGAA CAAGATGATG ACAGTAATCC TGACAAAGCA TTAAATACGT
D S E Q D D D S N P D K A L N T L Frame 1

1451 TGAAAGAAAA TGCTGTAGCA ACGCCGAAGA ACCAAACGCA ACAAATGTA
K E N A V A T P K N Q T Q Q N V Frame 1

1501 GAAAAAGCGA ATGAACAACC TAATAAAGCT GCAAAACAAG GACAGTATAA
E K A N E Q P N K A A K Q G Q Y K Frame 1

1551 AAACCAAGAT CCTATCATTT TAGTGCATGG TTTCAATGGC TTTACTGATG
N Q D P I I L V H G F N G F T D D Frame 1

1601 ATATTAATCC AGCGGTATTA GCTCATTATT GGGGTGGAGA TAAATTGAAT
I N P A V L A H Y W G G D K L N Frame 1

1651 ATCCGCCAAG ATTTAGAAAAG TAATGGTTAT GAAACATACG AAGCGAGCGT
I R Q D L E S N G Y E T Y E A S V Frame 1

1701 TGGTGCATTA AGTAGTAACT ACGATCGTGC CGTTGAGCTT TATTACTATA
G A L S S N Y D R A V E L Y Y Y I Frame 1

1751 TTAAGGGTGG CACGGTAGAT TATGGTGCAG CCCATGCTGA GAAGTACGGT
K G G T V D Y G A A H A E K Y G Frame 1

1801 CATGAACGTT ATGGTAAAAC ATATGAAGGT GTATATAAAG ATTGGCAACC
H E R Y G K T Y E G V Y K D W Q P Frame 1

1851 AGGTAAAAAA GTTCACTTAG TGGCTCATAG TATGGGTGGA CAAACAGTGA
G K K V H L V A H S M G G Q T V R Frame 1

1901 GACAACTTGA AGAATTATTG CGTAACGGTA ATCAAGAAGA AATAGAATAT
Q L E E L L R N G N Q E E I E Y Frame 1

1951 CAAAAAGAAC ATGGCGGTGA GATTTCTCCA CTATTCCAAG GCAATAACGA
Q K E H G G E I S P L F Q G N N D Frame 1

2001 TAATATGGTG AATCAATTA CTACTATTGG TACGCCTCAT AATGGTACAC
N M V N S I T T I G T P H N G T H Frame 1

2051 ATGCTGCAGA TGCATTAGGT AATGAGGCGA TAGTTAGACA ATTAGCATTT
A A D A L G N E A I V R Q L A F Frame 1

2101 GATTACGCCA AATTCAAAGG TAATAAAAAC TCAAAGTAG ATTTTGGTTT
D Y A K F K G N K N S K V D F G F Frame 1

2151 TGGCCAGTGG GGTCTTAAAC AGAGAGAAGG AGAAACGTAC GCTCAATACG
G Q W G L K Q R E G E T Y A Q Y V Frame 1

2201 TACAACGCGT TCAAAAATAGC GGATTATGGA AACAGAAGA CAACGGATTT
Q R V Q N S G L W K T E D N G F Frame 1

2251 TATGATTTGA CTAGGGAAGG TGCTGCTAAA TTAAATAAAA ACACATCGTT
Y D L T R E G A A K L N K N T S L Frame 1

2301 AAACCCCTAAC ATGTGCTATA AAACATACAC TGGAGAATCA ACAAGACCTA
N P N I V Y K T Y T G E S T R P T Frame 1

2351 CTTTGTGGTGG CAATCAAAAA TCCGATGTTA ATTTGTTTCCT ACCATTTACT
L F G N Q K S D V N L F L P F T Frame 1

2401 GTAACGGGTA ATGTAATTGG CAAAGCTGCA GAAAAAGAAT GCGGTGAAAA
V T G N V I G K A A E K E W R E N Frame 1

2451 TGACGGCTTA GTCTCTACTA TTTCATCACA ACATCCATTT AATCAAGCCT
D G L V S T I S S Q H P F N Q A F Frame 1

2501 TTATAGAAGC TACGGACGAA GTGAAAAAAG GTGTATGGCA AGTGACTCCA
I E A T D E V K K G V W Q V T P Frame 1

2551 ATTAACACAG GTTGGGACCA TGTAGATTTT GTTGGTCAAG ATTCTACTGA
I K H G W D H V D F V G Q D S T D Frame 1

2601 CTCA**AATCAT** **CCTACTGAGG** **AGTTACAACA** GTTTTGGCAC AATTTAGCAG
S N H P T E E L Q Q F W H N L A E Frame 1

2651 AAGATTTAGT **TCGTAACGAG** **CAATTTGATG** **CTTA**AATAAA AATTGAATTA
D L V R N E Q F D A * Frame 1

2701 TAATAAGGGA GGTAATGATT ATGACTGGAG

CAPÍTULO II

Detecção de genes de enterotoxinas de estafilococos coagulase positiva isolados de produtos de origem animal comercializados em Santa Catarina

2.1 INTRODUÇÃO

A importância dos produtos de origem animal como alimentos básicos para a população é muito conhecida, e assumindo uma dimensão social dificilmente superada por outros setores produtivos, pois garantem a sustentabilidade de muitas regiões brasileiras, a exemplo da região Oeste de Santa Catarina.

A lingüiça colonial e o queijo colonial são produtos de grande aceitação na região sul do Brasil, especialmente por fazerem parte da gastronomia de origem italiana e alemã e também pela cultura na produção de suínos e gado leiteiro em pequenas propriedades, para o consumo domiciliar ou para a comercialização. Tradicionalmente, a lingüiça e o queijo colonial são produzidos de maneira artesanal, no próprio domicílio ou em pequenas agroindústrias, sendo comercializado em feiras livres, supermercados e bancas de produtos coloniais localizadas ao longo de rodovias.

Da mesma forma que cresceu a produção e o consumo destes derivados, têm crescido no Brasil e em muitos países em desenvolvimento as exigências do consumidor por qualidade, em especial, por segurança alimentar. De fato, esse aspecto constitui-se problema relevante de saúde pública e não há como negar que programas que busquem a melhoria dos produtos, em geral, são necessários.

Estima-se que, anualmente, ocorram 1,5 bilhão de episódios de gastroenterocolite aguda em todo o mundo, dos quais 70% são causados pela ingestão de alimentos contaminados (SATCHER, 2000). Considerando apenas os agentes biológicos patogênicos para os humanos como bactérias, vírus, protozoários, parasitas e toxinas naturais, muitos são transmitidos pela água e alimentos, somando mais de 250 doenças de origem alimentar descritas (BALBANI; BUTUGAN, 2001; LE LOIR; BARON; GAUTIER, 2003). Segundo Tauxe (2002), existem aproximadamente 27 patógenos causadores de doenças transmitidas por alimentos (DTAs), que contribuem com 19% do número total desses casos e 36% dos casos de mortes, sendo os demais casos causados por patógenos ainda não identificados.

As DTAs causam impacto na saúde pública e segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), em países industrializados, o percentual de pessoas acometidas pelas DTAs tem aumentado, aproximadamente, 30% a cada ano (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2007). É estimado que somente nos Estados Unidos, as DTAs afetem de 6 a 80 milhões de pessoas a cada ano, causando mais de 9 mil mortes, e

um custo aproximado de 5 bilhões de dólares (PELES et al., 2007). Na França, por um período de dois anos (1999 a 2000), ocorreram, 1.267 surtos de DTAs, envolvendo 17.378 pessoas, causando 1.383 hospitalizações e 10 mortes (LE LOIR; BARON; GAUTIER, 2003). É importante ressaltar que a incidência de DTAs é provavelmente subestimada, porque apenas 10% dos pacientes adultos com diarreia procuram os serviços médicos e, destes, somente 20% são submetidos a exames de coprocultura e pesquisa de vírus (BALBANI; BUTUGAN, 2001; SATCHER, 2000).

Staphylococcus aureus é considerado a terceira mais importante causa de doença de origem alimentar no mundo (BOEREMA; CLEMENS; BRIGHTWELL, 2006; NORMANNO et al., 2005; PELES, 2007). Entre os alimentos envolvidos em intoxicação estafilocócica, carne, leite e seus derivados, especialmente os produtos que necessitam de maior manipulação, tem um importante papel devido ao freqüente isolamento de linhagens enterotoxigênicas nestes produtos (NORMANNO et al., 2005; NORMANNO et al., 2007).

Embora o *S. aureus* seja encontrado com relativa freqüência como membro da microbiota normal do corpo humano, o mesmo causa intoxicação gastrointestinal devido à produção de enterotoxinas estafilocócicas nos alimentos (BALABAN; RASOOLY, 2000; CUNHA et al., 2006; LE LOIR; BARON; GAUTIER, 2003). É uma das bactérias patogênicas mais importantes, uma vez que atua como agente de infecções de baixa e de elevada gravidade (MARTINS; KOGA-ITO; JORGE, 2002; NORMANNO et al., 2005). Sua patogenicidade é crescente devido à ampla resistência aos antibióticos (MELO et al., 2005) e capacidade de adaptação ao meio ambiente, podendo sobreviver extremamente bem fora do hospedeiro formando biofilme em superfícies de inox e vidro (HECKER; ENGELMANN; CORDWELL, 2003; MARQUES et al., 2007).

S. aureus produz inúmeras exoproteínas que contribuem com sua habilidade de colonizar e causar doenças nos hospedeiros. Todas as linhagens secretam um grupo de enzimas e citotoxinas que incluem quatro hemolisinas (alfa, beta, gama e delta), nucleases, proteases, lípases, hialuronidase e coagulase. Algumas linhagens produzem exoproteínas adicionais, que incluem a Toxina-1 da síndrome do choque tóxico – TSST-1, as toxinas esfoliativas Eta e Etb, que causam a síndrome estafilocócica da pele escaldada e as enterotoxinas SEA, SEB, SEC, SED, SEE, SEG, SEH, SEI, SEJ, SEK, SEL, SEM, SEN, SEO, SEP, SEQ, SER, e SEU (BLAIOTTA et al., 2004; LE LOIR; BARON; GAUTIER, 2003).

Apesar de *S. aureus* ser produtor de várias enterotoxinas, 95% dos surtos de intoxicação alimentar foram causados pela enterotoxinas clássicas: SEA, SEB, SEC, SED e SEE (LETERTRE et al., 2003). As enterotoxinas estafilocócicas são termoestáveis, resistindo ao calor (100° C por 30 minutos) e permanecendo ativas nos alimentos mesmo após seu processamento térmico. Apresentam ainda resistência à inativação por proteases gastrintestinais, como a pepsina, o que explica sua capacidade de permanecer ativa após a ingestão (ATANASSOVA; MEINDL; RING, 2001; BALABAN; RASOOLY, 2000; SORIANO et al., 2002).

A quantidade de enterotoxina estafilocócica suficiente para causar os sintomas característicos da intoxicação alimentar é muito pequena, variando de 20 ng a 1 µg (NORMANNO et al., 2007), e calcula-se que aproximadamente 10⁵ UFC de *S. aureus* por grama ou mL de alimento são necessários para provocar um quadro de intoxicação (SORIANO et al., 2002; LAMAITA et al., 2005; FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2007).

A identificação de enterotoxinas produzidas pelos *Staphylococcus* spp. é importante pois através dela é possível determinar a origem da contaminação do alimento. Por exemplo, as enterotoxinas SEA e SEB têm sido associadas com contaminação envolvendo manipuladores de alimentos, já as enterotoxinas SEC e SED estão relacionadas com contaminação de origem animal, principalmente bovinos e suínos (CARMO et al., 2002; NÁJERA-SÁNCHEZ et al., 2003).

Vários estudos no Brasil demonstram que a contagem de estafilococos coagulase positiva em lingüiça colonial e leite e derivados pode estar acima dos parâmetros máximos permitidos pela legislação (BRASIL, 2001) (ADESIYUM; WEBB; ROMAIN, 1998; ALMEIDA FILHO; NADER FILHO, 2000; ANUNCIAÇÃO et al., 1994; ARAGON-ALEGRO et al., 2007; ARAÚJO et al., 2002; BORGES et al., 1999; CARMO; BERGDOLL, 1990; CARMO et al., 2002; CHAPAVAL et al., 2006; LAMAITA et al., 2005; LOGUERCIO; ALEIXO, 2001; PEREIRA, 2007).

Uma vez que as DTAs representam considerável perigo para a saúde humana e para a economia, seu controle requer união de esforços do governo, das indústrias de alimentos e dos consumidores (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2007).

2.2. OBJETIVOS

2.2.1 Objetivo geral

Detectar por PCR multiplex a presença de genes que codificam para as enterotoxinas estafilocócicas clássicas (SEA, SEB, SEC, SED e SEE) e gene específico para *Staphylococcus aureus* (*femA*) em linhagens isoladas de produtos de origem animal (queijos e embutidos cárneos) comercializados em Santa Catarina.

2.2.2 Objetivos específicos

- Quantificar a contaminação por *Staphylococcus aureus*, através de método convencional, em amostras de salaminho, lingüiça colonial e queijos mussarela, prato e colonial;
- Confirmar, através da presença do gene *femA*, as linhagens de *Staphylococcus aureus* isoladas dos produtos derivados de carne e leite;
- Detectar a presença de genes codificadores para as enterotoxinas SEA, SEB, SEC, SED e SEE nas linhagens de *S. aureus* isoladas.

2.3 REVISÃO DE LITERATURA

2.3.1 *Staphylococcus* spp.

Os estafilococos são bactérias em forma de cocos esféricos de 0,5 a 1,5 µm de diâmetro; ocorrem isolados, aos pares ou em grupos que se assemelham a cachos de uva irregulares; são anaeróbios facultativos, porém crescem melhor aerobicamente (HOLT et al., 1994; TORTORA; FUNKE; CASE, 2000). O gênero *Staphylococcus* inclui mais de trinta espécies sendo dezoito espécies e subespécies de interesse na área de alimentos. Destas somente seis (*S. aureus*, *S. aureus* subespécie *anaerobius*, *S. intermedius*, *S. delphini*, *S. schleiferi* subespécie *coagulans*, *S. hyicus*) são coagulase positiva e geralmente produzem nuclease termoestável (HOLT et al., 1994).

Entre os estafilococos coagulase negativa estão *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. saprophyticus*, *S. simulans*, *S. warneri*, *S. xylosus*, *S. caprae*, *S. cohnii*, *S. lentus*, *S. sciuri*, *S. shleferi* e *S. saccharolyticus* (HOLT et al., 1994). Dez entre eles apresentam capacidade de produzir enterotoxinas, mas não produzem nucleases, ou se produzem, elas são termossensíveis (JAY, 2005). Desta forma, a prática da pesquisa de estafilococos coagulase positiva em alimentos, levou a estimativas inferiores da real prevalência de linhagens produtoras de enterotoxinas (JAY, 2005).

Três espécies de estafilococos são patógenos humanos, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus* e *S. aureus* (STROHL; ROUSE; FISHER, 2004) sendo estas diferenciadas das outras espécies através de uma combinação de fatores como características morfotintoriais, produção de coagulase, termonuclease, acetoína, beta-galactosidase, fosfatase, alfa-toxina (hemólise), produção de ácidos a partir de manitol, maltose, xilose, sacarose, trealose, sensibilidade a novobiocina e a lisostafina, presença de ribitol no ácido teicóico e proteína A e fator de aglutinação na parede celular (LANCETTE; BENNETT, 2001). A característica isolada mais confiável para identificar *S. aureus* é determinada pela prova de coagulase (LANCETTE; BENNETT, 2001; STROHL; ROUSE; FISHER, 2004). Todos os estafilococos produzem catalase, enquanto que os estreptococos não produzem esta enzima (STROHL; ROUSE; FISHER, 2004).

Staphylococcus aureus é o principal representante dos estafilococos coagulase positiva, sendo considerado um importante patógeno para humanos e animais,

causando uma grande variedade de doenças, cuja gravidade varia desde uma infecção cutânea de menor significância até infecções graves como pneumonia e septicemia (NASCIMENTO; CORBIA; NASCIMENTO, 2001; NORMANNO et al., 2007).

Os *S. aureus* são bactérias mesófilas apresentando temperatura de crescimento na faixa de 7 °C a 48,5 °C, sendo a temperatura ótima de crescimento de 30 °C a 37 °C (HOLT et al., 1994 ; LE LOIR; BARON; GAUTIER, 2003). Geralmente podem crescer em concentrações de até 10% de NaCl e reduzem nitratos a nitritos, o que torna os alimentos curados veículos potenciais para as mesmas (HOLT et al., 1994). Em relação ao pH, *S. aureus* cresce na faixa de 4,2 a 9,3, sendo o ótimo entre 7 e 7,5 e o valor mínimo de atividade de água de 0,86 apesar de, sob condições ideais, esta bactéria já ter se desenvolvido com atividade de água de 0,83 (LE LOIR; BARON; GAUTIER, 2003).

As principais características do meio de cultura para o isolamento de *S.aureus* incluem: a capacidade de crescer na presença de 7,5 a 10% de NaCl; a capacidade de crescer na presença de 0,01% a 0,05% de telurito de potássio em combinação com 0,2% ou 0,5% de cloreto de lítio, e de 0,12% a 1,26% de glicina, ou 40 µg/mL de polimixina; a habilidade do *S. aureus* reduzir o telurito de potássio, produzindo colônias negras; a forma, a aparência e o tamanho das colônias; a pigmentação das colônias; a atividade de coagulase e de produção de ácidos em meios sólidos; a habilidade do *S.aureus* hidrolisar a lecitina de gema de ovo; a produção de fosfatase; a produção de termonuclease e crescimento a 42 °C a 43 °C em meios seletivos (LANCETTE; BENNETT, 2001).

S. aureus está presente nas narinas, garganta, trato intestinal, na pele e pêlos de animais de sangue quente, sendo que 30 - 50 % da população humana é portadora desta bactéria, sendo os índices mais elevados entre pessoas que trabalham em hospitais (BACHERT; GEVAERT; VAN CAUWENBERGE, 2002; LE LOIR; BARON; GAUTIER, 2003; NORMANNO et al., 2007). A cavidade nasal é o principal habitat dos *Staphylococcus* nos humanos e, a partir deste foco, atingem tanto a epiderme e lesões como o ar, água, solo, leite, esgoto e qualquer superfície ou objeto que tenha entrado em contato com humanos (RAPINI et al.,2005).

Doenças de origem alimentar causam preocupações no mundo todo. Foram descritas aproximadamente 250 diferentes tipos de doenças de origem alimentar, sendo que as bactérias são os agentes causadores de 2/3 dos surtos de origem

alimentar (LE LOIR; BARON; GAUTIER, 2003). Entre as bactérias predominantes envolvidas em toxinfecções alimentares está o *S. aureus* que causa intoxicação gastrointestinal devido à absorção de enterotoxinas estafilocócicas pré-formadas nos alimentos (BALABAN; RASOOLY, 2000; LE LOIR; BARON; GAUTIER, 2003).

Segundo Lancette e Bennett (2001), existem três razões para investigar a presença de *S. aureus* em alimentos: para confirmar que este microrganismo pode ser o agente causador de uma DTA; para determinar quando um alimento ou ingrediente alimentar é fonte potencial de estafilococos enterotoxigênico; e para demonstrar contaminação pós-processamento, que usualmente é devido ao contato do alimento processado com humanos ou exposição do alimento em superfícies inadequadamente sanitizadas.

2.3.2 Enterotoxinas

Segundo Atanassova, Meindl, Ring (2001), o *Staphylococcus aureus* em muitos países, é considerado o segundo patógeno mais freqüente causador de DTA(s), produzindo compostos extracelulares como as enterotoxinas estafilocócicas. As enterotoxinas são produzidas principalmente por *S. aureus*, porém outras espécies, coagulase positiva, como *S. intermedius* e *S. hyicus* têm sido incriminadas como enterotoxigênicas (BERGDOLL, 1990; LANCETTE; BENNETT, 2001; BLAIOTTA et al., 2004; LE LOIR; BARON; GAUTIER, 2003). *S. intermedius* foi isolado de manteiga líquida e margarina sendo identificado com causador de intoxicação alimentar (LANCETTE; BENNETT, 2001).

Entre os *Staphylococcus* coagulase negativa, as espécies *S. chohnii*, *S. epidermis*, *S. xylosus* e *S. haemolyticus* tem sido isoladas de leite de ovelhas com produção de uma ou várias enterotoxinas (LE LOIR; BARON; GAUTIER, 2003). No Brasil, foram isolados *Staphylococcus* coagulase negativa de vários alimentos. *S. epidermidis* foi a linhagem predominante com 40 % dos isolados, seguido do *S. warneri* (20 %), *S. xylosus* (20 %), *S. saccharolyticus* (15 %) e *S. hominis* (5 %). Entre as linhagens isoladas, quatro apresentaram genes para produção de enterotoxinas pelo método de PCR, com predominância do gene *sea* (CUNHA et al., 2006).

Mamprim Filho (2006) pesquisou genes enterotoxigênicos a partir de linhagens de *Staphylococcus* coagulase negativa e positiva isoladas de fossas nassais e mãos de manipuladores de alimentos. A prevalência dos isolados foi de 24,4% para *S. aureus* e 75,6% para *Staphylococcus* coagulase negativa (*S. warneri*, *S. epidermidis*, *S. capitis* e *S. Xylosus*). Foram detectadas as enterotoxinas SEA, SEC, SEE, SEG, SEH, SEI E SEJ, independente da espécie de *Staphylococcus*.

Apesar das espécies de estafilococos coagulase positiva serem as mais freqüentemente envolvidas em intoxicações alimentares, algumas espécies coagulase negativa também são produtoras de enterotoxinas, necessitando desta forma, de uma maior caracterização desse grupo de microrganismos em alimentos (CUNHA et al., 2006; VERAS, 2008).

As linhagens de *S. aureus* produzem uma grande variedade de exoproteínas que contribuem com sua habilidade de colonizar e causar doenças nos hospedeiros. Todas as linhagens secretam um grupo de enzimas e citotoxinas que incluem quatro hemolisinas (alfa, beta, gama e delta), nucleases, proteases, lipases, hialuronidase e coagulase. Algumas linhagens produzem exoproteínas adicionais, que incluem a Toxina-1 da síndrome do choque tóxico – TSST-1, as toxinas esfoliativas Eta, Etb, Etc e Etd que causam a síndrome estafilocócica da pele escaldada e as enterotoxinas – SEs, que são a causa direta de intoxicação alimentar estafilocócica (BALABAN; RASOOLY, 2000; BLAIOTTA et al., 2004). As enterotoxinas, assim como TSST-1, pertencem à família dos superantígenos (HWANG et al., 2007; MEHROTRA; WANG; JOHNSON, 2000).

As enterotoxinas estafilocócicas são nomeadas de acordo com a atividade emética e o fator etiológico do alimento envolvido na intoxicação estafilocócica, mas o mecanismo exato ainda não é totalmente conhecido (HWANG, et al., 2007). Várias enterotoxinas estafilocócicas são descritas como *SE-like* devido a sua fraca atividade emética, ou porque seu efeito emético ainda não foi testado em modelos primatas (HWANG et al., 2007).

São conhecidas 19 tipos de enterotoxinas estafilocócicas com a inclusão *SE-like*-SEIs, 5 enterotoxinas clássicas (SEA a SEE) de intoxicação estafilocócicas de origem alimentar (BALABAN; RASOOLY, 2000; HWANG et al., 2007) e 14 tipos adicionais que foram recentemente descritas (SEG a SEI) ou SEIs (SEIJ a SEIR, SEIU e SEIV) (HWANG et al., 2007; JARRAUD et al., 2001; LETERTRE et al., 2003; OMOE

et al., 2002; ORWIN et al., 2001, 2003; SU, WONG, 1995). Além disso, para SEC, SEG, SEI e SEU existem informações de algumas variantes (ABE et al., 2000; BLAIOTTA et al., 2004; LETERTRE et al., 2003; OMOE et al., 2002;).

Muitos estudos avaliaram a ocorrência das cinco enterotoxinas clássicas (SEA, SEB, SEC, SED e SEE) em linhagens estafilocócicas de origem alimentar e/ou diretamente de amostras de alimentos (ADWAN; ABU-SHANAB; ADWAN, 2005; ARAGON-ALEGRO, et al., 2007; BALABAN; RASOOLY, 2001; CARMO et al., 2002; CUNHA NETO; SILVA; STAMFORD, 2002; ERCOLINI et al., 2004; FUEYO et al., 2001; MARTÍN; GONZÁLEZ-HEVIA; MENDOZA, 2003; NEMA et al., 2007; PORTOCARRERO; NEWMAN; MIKEL, 2002).

As enterotoxinas estafilocócicas mais freqüentemente isoladas de surtos de intoxicação alimentar são a SEA e SED (ARAGON-ALEGRO et al., 2007; ATANASSOVA; MEINDL; RING, 2001; BALABAN; RASOOLY, 2000; NÁJERA-SÁNCHEZ et al., 2003; PORTOCARRERO; NEWMAN; MIKEL, 2002), possivelmente porque podem ser produzidas em amplas condições de crescimento (Aa, pH e potencial de oxi-redução) (ARAGON-ALEGRO et al., 2007).

Com relação às últimas enterotoxinas descritas, segundo Blaiotta et al. (2004), a relação destas e a intoxicação alimentar humana não é completamente entendida. Além disso, existem poucos estudos a respeito da incidência dos genes que codificam estas novas enterotoxinas, sendo estes principalmente de amostras clínicas ou de coleções bacterianas (ABE et al., 2000; BECKER et al., 2003; OMOE et al., 2002;).

As enterotoxinas são um grupo de proteínas simples, com baixo peso molecular, de 26.000 a 29.600 daltons, que são produzidas durante todas as fases do crescimento bacteriano, mas principalmente durante a metade e o fim da fase exponencial (BALABAN; RASOOLY, 2000; NORMANNO et al., 2005; SORIANO, et al., 2002;). Para que ocorra sua produção é necessário uma contagem de 10^5 UFC/g de *Staphylococcus aureus* (CARMO et al., 2002 ; FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2007). Assim sendo, esse crescimento pode ser reduzido através da produção de ácido láctico pela fermentação e conseqüentemente redução do pH. O sistema lactoperoxidase, a competição por nutrientes, a produção de enterotoxinas, e a produção de outras substâncias inibidoras tais como a nisina também reduzem o crescimento de *Staphylococcus* (CARMO et al., 2002).

As células de *S. aureus* são consideravelmente mais sensíveis ao calor que as enterotoxinas, apresentando valores D para inativação térmica de 3 a 8 minutos a 121 °C (PELES et al., 2007). Como resultado, as enterotoxinas podem estar presentes em alimentos, resistindo ao calor (cozimento, pasteurização) e permanecendo ativas nos alimentos por longos períodos de tempo, mesmo na ausência de células viáveis (CASTRO et al., 2002; JORGENSEN et al., 2005; PELES et al., 2007)

A quantidade de enterotoxina estafilocócica suficiente para causar os sintomas característicos da intoxicação alimentar é muito pequena, variando de 20 ng a 1 µg (NORMANNO et al., 2007). Os sintomas aparecem pouco tempo após a ingestão de alimentos contaminados, variando de 30 minutos a 8 horas, dependendo da susceptibilidade do indivíduo e da dose de enterotoxina ingerida. Os sinais e sintomas são caracterizados por náuseas, vômito, diarreia, dores abdominais, sudorese e, eventualmente dores de cabeça, calafrios, queda de pressão arterial, prostração e raríssimas vezes, febre (LE LOIR; BARON; GAUTIER, 2003; NASCIMENTO; CORBIA; NASCIMENTO, 2001; NORMANNO et al., 2007).

2.3.3 Alimentos envolvidos em intoxicações estafilocócicas

A capacidade do *S. aureus* crescer e produzir enterotoxinas sob várias condições é evidente, uma vez que uma grande variedade de alimentos foi envolvida em intoxicação alimentar estafilocócica (LE LOIR; BARON; GAUTIER, 2003; MORANDI et al., 2007). Os alimentos que são freqüentemente envolvidos são carnes e derivados, leite e derivados, saladas com ovos, atum, batatas e massas, produtos de panificação, assim como tortas recheadas com creme, bombas de chocolate, sanduíches recheados, pratos prontos para o consumo, entre outros (LE LOIR; BARON; GAUTIER, 2003; FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2007).

Blaiotta et al. (2004) avaliaram a ocorrência de várias enterotoxinas estafilocócicas e do gene *tsst-1* (Toxina 1 da Síndrome do Choque Tóxico) em linhagens estafilocócicas isoladas de carne e derivados de leite comercializados na Itália. De 109 linhagens de *Staphylococcus* spp. analisadas, 11 foram confirmadas como *S. aureus*, detectando-se os genes *seg*, *sei*, *sem*, *sen*, *seo* e *tsst-1*.

Hwang et al. (2007) declararam que muitos surtos de intoxicação estafilocócica de origem alimentar são suspeitos de terem sido causados pelas SEs ou SEIs recentemente descritas. Ikeda et al. (2005) relataram um surto de intoxicação estafilocócica com mais de 10 mil casos registrados, envolvendo leite desnatado em pó reconstituído no Japão. Os resultados revelaram claramente que a intoxicação alimentar foi causada por múltiplas enterotoxinas SEA e SEH. Outro surto também no Japão, envolvendo a enterotoxina SEH, ocorreu com purê de batatas preparado com leite cru de bovinos (JORGENSEN et al., 2005).

Normanno et al. (2005) investigaram a presença de estafilococos coagulase positiva e *S. aureus* em vários alimentos (carne, hambúrguer, derivados de peixe, leite e derivados, sorvete, macarrão, etc.) comercializados na Itália. Foram isoladas 1.971 linhagens de estafilococos coagulase positiva que levaram a identificação de 537 *S. aureus* testados quanto à capacidade de produção de SEA, SEB, SEC e SED. Um total de 298 linhagens de *S. aureus* (55, 5%) produziram uma ou mais enterotoxinas.

Aragon-Alegro et al. (2007) analisaram a qualidade microbiológica de sobremesas, sanduíches, derivados de leite entre outros alimentos, comercializados no estado de São Paulo. *Staphylococcus* coagulase positiva foi isolado em 26 amostras (15,1%) de 172. A partir de 50 linhagens de *S. aureus* isoladas das amostras de alimentos, foi verificada a produção de uma ou mais enterotoxinas em 27 (54%) das amostras. A enterotoxina SEC foi a mais freqüentemente detectada seguida da SEA, SEA e SEC, SEB, SEA e SEC através de ensaio imunológico (ELISA).

Salame (Lingüiça colonial)

Os produtos cárneos frescos tiveram sua origem nos países frios do norte europeu; produtos cozidos, defumados e semi-secos são originários da Alemanha; produtos secos foram desenvolvidos principalmente nos países de verão quente do sul da Europa (OLIVEIRA; ARAÚJO; BORG, 2005).

No Brasil, a produção de salames teve origem nos mais antigos métodos de conservação de alimentos conhecidos pelo homem. Estes métodos foram trazidos para o país pelos imigrantes italianos e alemães, principalmente na região sul do país, que iniciaram com a produção caseira, a qual com o passar do tempo, originou as

pequenas fábricas e hoje constitui um importante segmento da indústria de derivados cárneos (CASTRO; LUCHESE; MARTINS, 2000; LOBO, 2001).

Apesar de atualmente, a carne poder ser preservada através de outras formas de conservação como o congelamento, refrigeração e utilização do calor os embutidos fermentados, curados e desidratados são produzidos em grande escala devido ao seu único e muito apreciado sabor (ARNAU et al., 2007).

O salame é um produto cárneo industrializado obtido de carne suína ou da mistura entre carne suína e bovina, adicionado de toucinho, ingredientes, embutido em envoltórios naturais e/ou artificiais, curado, fermentado, maturado, defumado ou não e dessecado (BRASIL, 2000). As características de identidade e qualidade de oito tipos de salame (Salaminho, Salame tipo Alemão, Salame tipo Calabresa, Salame tipo Friolano, Salame tipo Napolitano, Salame tipo Hamburguês, Salame tipo Italiano, Salame tipo Milano) estão definidos, sendo que a diferenciação entre eles está no tipo de matéria-prima, na granulometria da carne e do toucinho, com ênfase na condimentação (BRASIL, 2000; MARTINS, 2006; TERRA, 2006). A denominação de salame colonial, apesar de ser muito utilizado em publicações nacionais e nos rótulos dos produtos, não está cadastrada no Ministério da Agricultura do Abastecimento, não existindo nenhum regulamento técnico de identidade e qualidade para salame colonial, o que existe é a denominação de lingüiça colonial (BRASIL, 2000; PEREIRA, 2007).

O salame tem como ingredientes obrigatórios a carne suína (mínimo de 60%, exceto para o salame tipo hamburguês, onde o teor permitido é de no mínimo 50%), toucinho, sal, nitrito e/ou nitrato de sódio e/ou potássio. Como ingredientes opcionais pode possuir carne bovina, leite em pó, açúcares, maltodextrinas, proteínas lácteas, aditivos intencionais, vinho, condimentos, aromas e especiarias e substâncias glaceantes (BRASIL, 2000).

No Brasil, o salame tipo italiano é obtido a partir de carne suína com maturação de aproximadamente trinta dias, com aroma e sabor suaves, com pH em torno de 5,4 (TERRA, 2006). O processo de fabricação ocorre em duas fases: na primeira, há a fermentação com ocorrência simultânea de acidificação e de formação de cor durante sete dias; a segunda, conhecida como maturação, consiste na desidratação como decorrência da fermentação, por vinte três dias (FERNÁNDES et al., 2001; TERRA, 2006).

E ainda, segundo Martins (2006), de forma mais detalhada, o processo de elaboração do salame passa pelas fases de recebimento de matérias-primas e insumo, moagem da matéria-prima, mistura dos temperos e condimentos, embutimento, secagem e maturação, embalagem e estocagem.

Na seleção da matéria-prima, recomenda-se a utilização de carnes com valores de pH de 5,4 e 5,8 para facilitar a penetração dos agentes de cura e do sal impedindo a multiplicação de microrganismos patogênicos e deteriorantes no embutido (CAMPAGNOL; FRIES; TERRA, 2007; MARTINS, 2006). A gordura deve apresentar uma proporção entre ácidos graxos saturados e insaturados para manter-se em estado sólido em temperatura ambiente e em proporções que evitem a rancidez e defeitos no sabor e aroma (CAMPAGNOL; FRIES; TERRA, 2007).

Os agentes de cura, as especiarias, a desidratação, a reduzida tensão de oxigênio, a acidez e anaerobiose favorecem uma inversão da microbiota Gram negativa para Gram positiva, que são os principais envolvidos no desenvolvimento das características organolépticas dos embutidos curados (ORDÓÑEZ, et al., 2005).

Os sais de nitrato e/ou nitrito de sódio ou potássio agem como inibidores da germinação de esporos e formação de toxinas, principalmente de *Clostridium botulinum*. Contribuem também, conferindo cor, sabor e proteção contra a oxidação lipídica no produto (ZHANG; KONG; XIONG, 2007). Apesar de todas as suas propriedades desejáveis, a segurança da utilização de nitrito para saúde humana apresenta efeitos adversos representados principalmente, pela metamioglobina tóxica e pela formação de nitrosaminas (OLIVEIRA; ARAÚJO; BORGIO, 2005; ZHANG; KONG; XIONG, 2007).

A utilização de culturas iniciadoras é essencial para o controle de microrganismos deteriorantes e patogênicos além de refinar o sabor, aroma e textura do produto durante o processamento de salames, podendo ser utilizadas tanto puras como combinadas (MARTÍN et al., 2005; MARTINS, 2006; TERRA, 2006). Estes microrganismos podem ser agrupados em bactérias ácido lácticas (*Lactobacillus* e *Pediococcus*) responsáveis pelo processo de acidificação e as bactérias flavorizantes (*Staphylococcus xylosus* e *Staphylococcus carnosus*) ligadas à coloração, aroma e sabor do embutido (LEROY; VERLUYTEN; VUYST, 2006; TERRA, 2006).

A presença de coadjuvantes tecnológicos, classificados como antioxidantes, estabilizantes (ascorbato de sódio, açúcares e polifosfato), bem como alterações nos processos de atividades bioquímicas também proporcionam variáveis de grande

influência no aprimoramento da qualidade dos produtos cárneos curados (CAMPAGNOL; FRIES; TERRA, 2007; ORDÓÑEZ, et al., 2005).

A maturação, devido à alta possibilidade da massa deteriorar, é a etapa mais sensível durante o processamento do salame, onde ocorrem numerosas reações enzimáticas catalisadas tanto por enzimas tissulares como microbianas, originando substâncias que contribuem para o sabor e aroma do produto final (CAMPAGNOL; FRIES; TERRA, 2007; MARTINS, 2006;).

O produto final se conserva a temperatura ambiente e apresenta um aumento da vida-de-prateleira em consequência da inibição de bactérias patogênicas e deteriorantes (FERNÁNDES et al., 2001). No caso de subdivisão ou embalagens a vácuo de produtos fatiados, este deve ser mantido em temperatura de refrigeração (MARTINS, 2006).

O salame (lingüiça colonial) tem sido objeto de estudo de vários pesquisadores em diferentes regiões do país. Entre os parâmetros analisados, os microbiológicos correspondem a maior parte dos artigos nacionais publicados. Um estudo realizado no município de Chapecó-SC analisou 50 amostras de salames (lingüiça colonial) e os resultados revelaram a presença de *Salmonella* em 6% das amostras, e de *E. coli* em 84% das amostras sendo que 72% das amostras em níveis acima do número máximo (1×10^3 NMP/g) permitido para consumo humano (MAGNANI et al., 2000).

No estado do Rio Grande do Sul, foram realizadas duas pesquisas no município de Santa Rosa. A primeira realizada por Lobo et al. (2001), onde de 60 amostras de salames (lingüiça colonial) analisadas, 67% foram classificadas como impróprias para o consumo. Em 65% das amostras as contagens de *S.aureus* foram maior ou igual a 10^6 UFC/g. A presença de clostrídios sulfito redutores foi detectada em 3,3% das amostras e o gênero *Salmonella* em 5%. E ainda, os coliformes a 45 °C foram detectados em níveis acima do permitido pela legislação em 35% das amostras.

O segundo estudo, realizado com 13 amostras de salames (lingüiça colonial), revelou presença de coliformes a 45 °C com valores acima do permitido pela legislação em 53,3% das amostras. Não foi isolado *Salmonella* dos produtos e *S. aureus* foi detectado em apenas uma amostra, com contagem na ordem de 10^5 UFC/g (RITTER et al., 2003). No Rio Grande do Sul 12,7% do total de 1.037 surtos investigados entre 1987 e 1998 foram atribuídos à *S. aureus* (SILVA et al., 2002).

Perazolli e Gelinski (2006) estudaram a qualidade microbiológica de salame artesanais de Arroio Trinta-SC. Foram analisadas 675 salames dos quais 58% apresentaram *S. aureus*, coagulase positiva, 7% *Salmonella* spp., 100% das amostras foram insatisfatórias para coliformes a 35 °C, 67% para coliformes a 45 °C com o isolamento de 27% de *E. coli*.

Um estudo de nossa autoria realizado em Santa Catarina, na região do Alto Uruguai Catarinense, avaliou parâmetros físico-químicos e microbiológicos em 12 amostras de salames (lingüiça colonial) industrializados. Os resultados mostraram uma contaminação microbiológica por *E.coli* em 83,3% das amostras e em níveis acima do permitido pela legislação em 25% delas. Todas as amostras apresentaram ausência de *Salmonella* (VIOTT; STOLBERG; PELISSER, 2006).

Outro trabalho de nossa autoria analisando salames (lingüiça colonial), industrializados, na mesma região do Alto Uruguai Catarinense avaliaram 6 marcas do produto detectando a presença de *Staphylococcus aureus*, coagulase positiva, em 83,3% das 18 amostras analisadas. Destas, 9 amostras (50%) estavam acima do limite estabelecido, estando em desacordo com a Resolução RDC No. 12 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) de 02 de janeiro de 2001, que permite até 5×10^3 UFC/g em produtos cárneos maturados. Esse estudo analisou ainda, a presença de *Toxoplasma gondii*, nas amostras e todos os resultados demonstraram ausência do mesmo (KLEIN et al., 2006).

Pesquisa realizada em São José do Rio Preto-SP, com 8 amostras de salames de uma indústria da região demonstrou que 25% das amostras estavam contaminadas com *Salmonella* spp. e com contagens de *S. aureus* na ordem de 10^4 UFC/g. No entanto, na avaliação de coliformes a 45 °C todas as amostras estavam de acordo com a legislação e não foi verificado a presença de clostrídio sulfito redutor (HOFFMAN; GARCIA-CRUZ; VINTURIM, 1997).

Uma pesquisa também realizada no estado de São Paulo, no município de Campinas, entre os anos de 2004 e 2005, avaliou a qualidade microbiológica de 90 amostras de salames industriais (tipo Italiano e Milano). Foi constada boa qualidade dos produtos para os parâmetros coliformes a 45 °C, estafilococos colagulase positiva e *Salmonella* spp., exceção para duas amostras, uma positiva para presença de *Salmonella* sp. e a outra positiva para enterotoxina estafilocócica (PEREIRA, 2007).

Na cidade do Rio de Janeiro, Borges et al. (1999) analisaram 81 amostras de salames (tipo Italiano, Milano, Friolano e Hamburguês) industrializados. Foram isolados *Listeria monocytogenes* de 6 amostras de salame tipo italiano.

Queijo mussarella, prato e colonial

O leite, devido à sua composição química, é considerado um excelente meio de cultura, podendo ser facilmente contaminado por vários microrganismos, especialmente bactérias patogênicas (CHYE; ABDULLAH; AYOB, 2004). Assim sendo, o leite deve ser obtido em excelentes condições higiênico sanitárias e mantido em temperaturas de refrigeração, desde a ordenha até o seu beneficiamento, visando à garantia das características físicas, químicas e nutricionais (BONFOH et al., 2003). A composição do leite, sua microbiota natural, a contaminação pós-pasteurização, o processamento e manipulação, os equipamentos, a temperatura inadequada durante estocagem e o transporte podem resultar em altos níveis de microrganismos patogênicos em queijos (ARAÚJO et al., 2002).

A análise de microrganismos como *Staphylococcus aureus* e coliformes são utilizados como indicadores de contaminação pós-processamento em indústrias de laticínios possibilitando o controle sanitário dos produtos (ARAÚJO et al., 2002).

Entende-se por queijo mussarella o queijo que se obtém por filagem de uma massa acidificada, (produto intermediário obtido por coagulação de leite por meio de coalho e/ou outras enzimas coagulantes apropriadas), complementada ou não pela ação de bactérias lácticas específicas. É um queijo de média, alta ou muito alta umidade e extra-gordo, gordo a semi-gordo segundo a classificação estabelecida no Regulamento Técnico Geral para fixação de Identidade e Qualidade de Queijos (BRASIL, 1997). Já o queijo Prato é um queijo gordo, de média umidade, maturado e se obtém através da coagulação do leite da mesma forma que o queijo mussarella, mas sem a etapa de filagem (BRASIL, 1997). O queijo minas frescal é um queijo fresco obtido também por coagulação enzimática do leite com coalho e/ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementada ou não com ação de bactérias lácticas. Sendo classificado como um queijo semi-gordo, de muito alta umidade, a ser consumido fresco, de acordo com a classificação estabelecida no Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos (BRASIL, 2004).

A presença de *Staphylococcus aureus* em leite e seus derivados tem sido objeto de vários estudos no Brasil (ADESIYUM et al., 1998; ALMEIDA FILHO; NADER-FILHO, 2000; ANUNCIACÃO et al., 1994; ARAÚJO et al., 2002; BORELLI et al., 2006; CARMO; BERGDOLL, 1990; VIEIRA-DA-MOTTA; FOLLY; SAKYIAMA, 2001).

Em algumas regiões do Brasil o queijo minas é comercializado com a denominação de “queijo colonial”, produzido principalmente por laticínios de pequeno porte, com fabricação simples e custo reduzido, representando a maior parte dos queijos comercializados em feiras livres, bares e mercearias (ROOS et al., 2005). Sendo desta forma, amplamente produzido e comercializado no Brasil, apresentando freqüentemente contaminação por microrganismos que oferecem riscos à saúde pública (ÁVILA et al., 2003).

A qualidade microbiológica do queijo colonial está relacionada a vários fatores como a qualidade de matéria-prima, que é influenciada pela sanidade do rebanho e higiene na obtenção do leite; o beneficiamento, que envolve o preparo da matéria-prima, tratamento térmico, higienização dos equipamentos, manipulação e armazenamento e ainda, a distribuição do produto e conservação (ARAÚJO et al., 2002; ROOS et al., 2005). Todos esses fatores associados à estocagem do produto em temperatura ambiente permitem o crescimento de *S. aureus* e *Staphylococcus* spp. e conseqüentemente a produção de enterotoxinas (ARAÚJO et al., 2002).

A produção e a comercialização de queijo colonial no Brasil, com leite não pasteurizado, são consideradas clandestinas, no entanto, esta prática tem sido freqüente, sendo um problema em saúde pública, pois se constitui em um veículo para inúmeros agentes etiológicos de enfermidades zoonóticas (ALMEIDA FILHO; NADER FILHO, 2000; ARAÚJO et al., 2002; CASTRO et al., 2002; IDE; BENEDET, 2001).

Leite não pasteurizado pode conter *Staphylococcus* devido à mastite, uma inflamação no úbere das vacas, causada principalmente por esta bactéria, produzindo em níveis reduzidos as enterotoxinas SEA e/ou SED (CASTRO et al., 2002).

No Brasil, tem-se evidenciado a presença de microrganismos patogênicos em queijo minas frescal, em diferentes regiões do país. Os diferentes estudos têm por objetivos avaliar as características físico-químicas e as condições microbiológicas deste produto. Almeida Filho e Nader Filho (2000) investigaram a presença e o número de cepas de *Staphylococcus aureus* em 80 amostras de queijo tipo minas frescal produzido artesanalmente e comercializado na cidade de Poços de Caldas, MG. Os

resultados obtidos evidenciaram a presença do microrganismo em 40 (50%) das amostras cujas contagens revelaram valores médios em torno de 10^5 UFC/g de queijo.

Em Cuiabá/MT, 29 (96,67%) amostras de queijo minas frescal, produzido artesanalmente, apresentaram valores superiores ao permitido pela legislação de *S. aureus* (LOGUERCIO; ALEIXO, 2001). Na cidade de Rio de Janeiro/RJ, *S. aureus* foi isolado em 20% das amostras de queijo minas frescal, dos quais 17,7 % estavam acima dos limites estabelecidos pela legislação brasileira (ARAÚJO et al., 2002).

Carmo et al. (2002) analisaram amostras de queijo Minas frescal e leite cru suspeitos de causarem dois surtos alimentares em Minas Gerais. As análises dos queijos mostraram que *S. aureus* estava presente nas amostras em contagens variando entre $2,4 \times 10^3$ a $2,0 \times 10^8$ UFC/g. Foi detectada a produção das enterotoxinas SEA, SEB e SEC. No leite cru foi identificada a presença de estafilococos coagulase negativa com contagens acima de $2,0 \times 10^8$ UFC/g e, foi detectada a produção das enterotoxinas SEC e SED.

Veras e colaboradores (2008) realizaram uma pesquisa no estado de Minas Gerais, com objetivo de identificar genes enterotoxigênicos isolados de *Staphylococcus* coagulase positiva e *Staphylococcus* coagulase negativa, obtidos a partir de derivados de leite envolvidos em 16 surtos de intoxicação alimentar. Foram selecionadas 15 linhagens de *Staphylococcus* coagulase positiva e 15 *Staphylococcus* coagulase negativa para realização da PCR e detecção da presença de enterotoxina através de imunoensaio. Das 30 linhagens selecionadas para pesquisa foram detectados genes enterotoxigênicos em 21 e muitas destas produziram enterotoxinas. Os genes enterotoxigênicos *sea* e *seb* foram os mais freqüentes. Em 5 linhagens coagulase negativa, foram detectados genes enterotoxigênicos e confirmada a presença da enterotoxina.

Buyser et al. (2001) fez uma estimativa do envolvimento de leite e derivados em doenças de origem alimentar na França e em diferentes países industrializados. Sete países indicaram que o leite e derivados estiverem envolvidos de 1 a 5% do total de surtos bacterianos e ainda, que o *S. aureus* foi o patógeno mais freqüentemente associado aos surtos (85 %) seguido pela *Salmonella* (10,1 %).

2.3. 4. Métodos de detecção

A análise microbiológica de um produto alimentício pode ser realizada através de inúmeros métodos, para investigar a presença ou ausência, para quantificar e para identificar e caracterizar as diferentes espécies de microrganismos. Os métodos abrangem análises bioquímicas, fenotípicas, imunológicas, muito aplicadas rotineiramente em laboratórios, e técnicas moleculares (SETTANNI; CORSETTI, 2007).

Atualmente, a caracterização fenotípica é o método padrão mais aplicado para identificação de bactérias, sendo os métodos genotípicos utilizados como alternativos ou complementares nesta identificação (SETTANNI; CORSETTI, 2007).

O método da reação em cadeia da polimerase (PCR) tem sido estabelecido em diagnósticos microbiológicos como uma valiosa ferramenta, rápida, com bom limite de detecção, seletividade e grande potencial para otimização (MALORNY et al., 2003; NÁJERA-SÁNCHEZ, 2003).

A PCR pode ser utilizada para caracterizar linhagens isoladas e purificadas através de métodos tradicionais de cultura, substituindo desta forma, a confirmação bioquímica e sorológica. Também pode ser aplicado na detecção direta de bactérias de alimentos ou a partir de caldos de enriquecimento e meios seletivos (RIJPENS; HERMAN, 2002). Esta técnica apresenta vantagens em relação às outras, pois oferece elevada eficácia e segurança, além de ser um método rápido e sensível (SOUZA; REIS; PIMENTA, 2005).

Existem vários procedimentos gerais para análise microbiológica de alimentos padronizados, como por exemplo, boas práticas de laboratório, preparação de amostras, validação de métodos e protocolos de PCR (RODRÍGUEZ-LÁZARO, et al., 2007).

O método PCR multiplex, consiste na amplificação simultânea de vários genes, através da utilização de múltiplos pares de iniciadores na mesma reação. É amplamente aplicado em várias áreas da microbiologia para identificação rápida de espécies microbianas sem comprometer a acurácia da análise (SETTANNI; CORSETTI, 2007).

O método imunológico, ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), é um ensaio utilizado para detectar enterotoxinas estafilocócicas de forma rápida e simples (SORIANO et al., 2002; NORMANNO et al., 2005). É baseado na reação do antígeno

com anticorpo específico fixo a uma matriz sólida, como esferas de poliestireno, placas de microtitulação, partículas metálicas revestidas de carbonato, e outras. E, ao antígeno fixo, liga-se outro anticorpo específico marcado por uma enzima. As enzimas utilizadas com essa finalidade são normalmente cromogênicas, sendo a fosfatase alcalina e a peroxidase as mais utilizadas nesses testes. Para o desenvolvimento da cor, muitos substratos podem ser utilizados: ABTS (ácido 2,2 – azino-bis (3-etil-benzotiazolin-6-sulfônico); o-toluidina; 4-cloro-1-naftol entre outros. A intensidade da cor pode ser observada visualmente ou medida com espectrofotômetros (JAY, 2005).

Outro método imunológico utilizado para detecção de enterotoxinas é de aglutinação em látex passiva e reversa (RPLA). Está baseado na aglutinação de partículas de látex sensibilizadas com anticorpos antitoxinas (SANT'ANA; AZEREDO, 2005).

No entanto, os métodos imunológicos disponíveis atualmente detectam somente as enterotoxinas estafilocócicas clássicas (SEA a SEE), podendo desta forma, subestimar a produção de enterotoxinas quando empregado de forma isolada (MORANDI et al., 2007).

Nájera-Sánchez et al. (2003), compararam a detecção de genes que codificam as enterotoxinas estafilocócicas clássicas através de PCR com a expressão desses genes através do ensaio imunológico ELISA. Os resultados obtidos mostram uma correlação de 100% para SEA e SEE, 86% para SEC, 89% para SED e 47% para SEB.

Segundo Veras et al. (2008) o método PCR é sensível e específico para realizar uma triagem das linhagens isoladas de surtos de intoxicação estafilocócica, sem levar em conta a expressão da enzima coagulase. Entretanto, a detecção de genes das enterotoxinas não indica necessariamente a capacidade do microrganismo produzir a toxina biologicamente ativa ou em quantidade suficiente para causar uma intoxicação.

Gene femA

Iniciadores específicos para detecção de *Staphylococcus aureus* através de PCR tem sido direcionados para os seguintes genes: *nuc* (termonuclease), genes de enterotoxinas, gene *tst* (síndrome do choque tóxico), genes *eta* e *etb* (toxinas

esfoliativas A e B), região *rDNA* 16-23, gene *23S rDNA* e gene *femA* (fator essencial de resistência a meticilina) (RIYAZ-UL-HASSAN; VERMA; QAZI, 2008).

Já foram identificados genes *fem*, denominados *femA*, *femB*, *femC*, *femD*, *femE* e *femF* (VANNUFFEL et al., 1995). Estes genes auxiliam o gene *mecA* à expressar um alto nível de resistência a meticilina e a outros beta-lactâmicos (MEHRORA; WANG; JOHNSON, 2000; SOUZA; REIS; PIMENTA, 2005). Ao contrário do gene *mecA*, os genes *fem* estão presentes tanto em linhagens estilocócicas resistentes a meticilina quanto naquelas que são susceptíveis a esta droga (BENSON et al., 2002).

O gene *femA* é universalmente presente em todos os isolados de *S. aureus* (MEHRORA; WANG; JOHNSON, 2000), não sendo encontrado em outras espécies de *Staphylococcus* (SOUZA; REIS; PIMENTA, 2005). O produto deste gene é uma proteína de 48 kDa, que desempenha um papel vital na síntese de peptidoglicano da parede celular de *Staphylococcus* (BENSON et al., 2002; MEHROTRA; WANG; JOHNSON, 2000).

Riyaz-Ul-Hassan Verma, Qazi, (2008) avaliaram três genes diferentes (*fmhA*, catalase e *femA*) como marcadores moleculares na detecção de *S. aureus* através de PCR. Eles concluíram que os três genes são conservados em *S. aureus* e poderiam ser utilizados como marcadores específicos na detecção e identificação deste microrganismo patogênico em amostras de alimentos, clínica e ambiental, através de PCR.

Silva et al. (2003) realizaram a identificação de 65 linhagens de estafilococos coagulase positiva através da utilização das sequências dos genes *coa* específico para *S. aureus* e *nuc* específicos para *S. intermedius* e *S. hyicus*.

2.4 MATERIAL E MÉTODOS

2.4.1 Amostras

Foram coletadas 72 amostras de alimentos de origem animal, queijo mussarela (15), queijo prato (15), queijo colonial (15), lingüiça colonial (18) salaminho (09) em estabelecimentos comerciais na região do Alto Uruguai Catarinense – AMAUC, no estado de Santa Catarina, Brasil, no período de 2005 a 2007. Todas as marcas dos queijos mussarela (A,B,C) e prato (D,E,F) analisadas eram submetidas aos Serviços de Inspeção Federal (SIF), enquanto que as marcas de queijo colonial eram provenientes de diferentes sistemas de inspeção, sendo a marca G por Inspeção Estadual (SIE), a marca H por Inspeção Municipal (SIM) e a marca I por SIF. Das seis marcas de lingüiça colonial analisadas, cinco marcas (A, B, C, D, E) eram inspecionadas pelo SIE e uma marca (G) pelo SIM (Concórdia-SC). As três marcas de salaminho (A, B, C) eram fiscalizadas pelo SIF.

2.4.2 Quantificação e identificação de *Staphylococcus aureus*

Foi realizada a quantificação e identificação de *Staphylococcus aureus* de acordo com Downes e Ito (2001). Para tanto, alíquotas de 25 g ($\pm 0,1$ g) de cada amostra de produto foram pesadas assepticamente e transferidas para embalagens estéreis do homogeneizador, tipo Stomacher, contendo 225 mL de água peptonada tamponada 0,1 % como diluente. A mistura foi homogeneizada por 60 segundos, sendo esta a primeira diluição 10^{-1} , a partir desta foi obtida a diluição 10^{-2} e 10^{-3} transferindo-se 1 mL da solução precedente para 9 mL do mesmo diluente.

Para a diluição 10^{-1} foram distribuídos seis volumes de 0,3 mL e dois volumes de 0,1 mL e das diluições 10^{-2} e 10^{-3} , foram semeados dois volumes de 0,1 mL de cada diluição na superfície do meio de cultura Ágar Baird-Parker, em placas de Petri. Em seguida, o inóculo foi espalhado por toda a superfície do meio, com o auxílio de uma alça de Drigalski e as placas foram incubadas em estufa a 35 °C (± 2 °C) por 48 horas, em posição invertida.

Para a contagem das colônias foram selecionadas placas, da mesma diluição, com 20 a 200 colônias com características típicas de *S. aureus*: colônias circulares, de coloração cinza escuro a preto, pequenas (máximo 1,5 mm de diâmetro), lisas, convexas, com bordas perfeitas, massa de células esbranquiçada nas bordas, rodeadas por uma zona opaca e/ou um halo transparente. Durante a contagem, os diferentes tipos de colônias suspeitas foram classificadas enumeradas e encaminhadas para os ensaios de identificação bioquímica.

Para a confirmação da presença de *Staphylococcus aureus*, foram realizadas semeaduras em meio de cultura Ágar MacConkey (controle negativo) e Ágar Sangue de 5 (cinco) colônias de cada placa. As placas com colônias que apresentaram colônias com hemólise positiva em Ágar Sangue foram selecionadas para as demais provas bioquímicas: coloração de Gram, coagulase, catalase, oxidase, urease e maltose.

2.4.3 Detecção através de PCR multiplex de genes das enterotoxinas clássicas e *femA*

O DNA genômico foi extraído a partir de 5 mL de uma cultura de estafilococos coagulase positiva após 16 a 24 horas de incubação a 35 °C (± 2 °C) com agitação de 150 rpm em caldo BHI utilizando Wizard® genomic DNA purification kit (Promega corporation, Madison, WI, USA) e adição de 120 μ L lisozima 10 mg/mL (Sigma Aldrich). As linhagens de *Staphylococcus aureus* produtores de enterotoxinas ATCC 13565 (SEA), ATCC 14458 (SEB), ATCC 19095 (SEC), ATCC 23235 (SED) e ATCC 27664 (SEE) foram utilizadas como controles positivos e a linhagem de *Staphylococcus xylosus* ATCC 29971, como controle negativo.

A detecção dos genes específicos para *S. aureus* (*femA*) e para as enterotoxinas SEA, SEB, SEC, SED e SEE foi realizada segundo Mehrotra, Gehua, Johnson (2000), com modificações. Os iniciadores (IDT,USA) descritos pelos autores estão apresentados na Tabela 4. Foram realizados três protocolos com diferentes concentrações de substratos e diferentes temperaturas para as reações de amplificação dos genes das enterotoxinas (Tabela 5).

Tabela 4 – Sequência dos iniciadores e tamanho dos produtos da PCR

Gene alvo	Sequência de Oligonucleotídeos (5' – 3')	Tamanho do amplicon (pb)
<i>sea</i>	GGTTATCAATGTGCGGGTGG CGGCACTTTTTTCTCTTCGG	102
<i>seb</i>	GTATGGTGGTGTAACTGAGC CCAAATAGTGACGAGTTAGG	164
<i>sec</i>	AGATGAAGTAGTTGATGTGTATGG CACACTTTTAGAATCAACCG	451
<i>sed</i>	CCAATAATAGGAGAAAATAAAAG ATTGGTATTTTTTTTCGTTC	278
<i>see</i>	AGGTTTTTTTACAGGTCATCC CTTTTTTTTCTTCGGTCAATC	209
<i>femA</i>	AAAAAAGCACATAACAAGCG GATAAAGAAGAAACCAGCAG	132

Fonte: MEHROTRA, WANG, JOHNSON, (2000)

Tabela 5- Protocolos de amplificação realizados com as amostras

Condições e Concentrações	Procolo 1	Procolo 2	Procolo 3
	Genes (<i>femA</i> , <i>sea</i> , <i>seb</i> , <i>sec</i> , <i>see</i>)	Genes (<i>femA</i> , <i>sec</i>)	Genes (<i>femA</i> , <i>sea</i> , <i>seb</i> , <i>sed</i> , <i>see</i>)
Cloreto de magnésio	1,5 Mm MgCl ₂	1,5 mM MgCl ₂	3,0 mM MgCl ₂
dNTP	0,2 mM de cada	0,2 mM de cada	0,2 mM de cada
Iniciadores	400 nM de cada <i>femA</i> , <i>sea</i> , <i>seb</i> , <i>sec</i> , <i>see</i>	400 nM de cada <i>femA</i> , <i>sec</i>	400 nM = <i>femA</i> , <i>sea</i> , <i>seb</i> , <i>see</i> 800 nM = <i>sed</i>
Taq DNA polimerase	1,25 unidade	1,25 unidade	1,25 unidade
DNA molde	10 a 300 ng	10 a 300 ng	10 a 300 ng
Volume final da reação	50 µL	25 µL	50 µL
Ciclo de temperatura	Mehrotra et al., 2000	Mehrotra et al., 2000	Modificações: anelamento: 52°C extensão: 3 min 72°C

Para as reações de padronização da PCR, simplex e detecção simultânea de *sea*, *seb*, *sec*, *see* e *femA* (protocolo 1) foram realizadas em um volume final de 50 microlitros contendo tampão de PCR (20 mM Tris-HCl, pH 8,4, 50 mM KCl), 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 400 nM de cada iniciador, 1,25 unidade de Taq DNA polimerase e 10 a 300 ng de DNA molde em termociclador Minicycler™ (MJ Research, Inc. Watertown, MA) com o seguinte ciclo de temperatura: 5 minutos a 94 °C para uma desnaturação inicial, 35 ciclos de 2 minutos a 94 °C, 2 minutos a 57 °C e 60 segundos a 72 °C, com uma extensão final de 7 minutos a 72 °C.

Para detecção simultânea de *sec* e *femA* (protocolo 2), foram mantidas as concentrações anteriores de acordo com Mehrotra, Gehua, Johnson (2000), alterando somente o volume final da reação para 25 µL.

Para detecção simultânea de *sea*, *seb*, *sed*, *see* e *femA* (protocolo 3), as reações de amplificação foram realizadas em um volume final de 50 µL contendo tampão de PCR (20 mM Tris-HCl, pH 8,4, 50 mM KCl), 3 mM MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 400 nM e ou 800 nM de cada iniciador, 1,25 U de Taq DNA polimerase e 100 a 300 ng de DNA molde. O perfil de amplificação foi padronizado em 5 minutos a 94 °C para uma desnaturação inicial, 35 ciclos de 2 minutos a 94 °C, 2 minutos a 52 °C e 3 minutos a 72 °C, com uma extensão final de 7 minutos a 72 °C.

O produto da PCR foi analisado através da eletroforese em gel de agarose 2% a 80 V por 70 min; evidenciado com brometo de etídio. Os géis foram analisados sob luz ultravioleta e as imagens digitalizadas utilizando câmera fotográfica CANON Powershot A70.

2.4.3 Análise Estatística

Os resultados de contaminação por *Staphylococcus* coagulase positiva nas amostras, foram analisados através do software Statistica (v. 6.0) aplicando-se Análise de Variância (ANOVA) e Teste de Diferença entre as Médias (LSD), ao nível de significância de 5%.

2.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.5.1 Contaminação por estafilococos coagulase positiva – ECP

A presença de estafilococos coagulase positiva (ECP) foi detectada em 33 amostras (45,8%) do total de 72 produtos de origem animal analisados. Em queijo colonial de 15 amostras analisadas, 12 (80%) apresentaram contaminação por ECP, em queijo prato, o percentual diminuiu para 40% (6 entre 15 amostras). No queijo mussarela, não foi detectada a presença de ECP em nenhuma das 15 amostras (Tabela 6).

Entre as amostras com presença de ECP, 72,2% (13 entre 18) apresentaram contagens acima do limite de 10^3 UFC.g⁻¹ estabelecido na Resolução RDC No. 12 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2001).

Tabela 6- Amostras de derivados de leite com estafilococos coagulase positiva

Alimentos	Número de amostras analisadas	Número de amostras ECP (%)	Amostras em desacordo com os parâmetros microbiológicos* (%)
Queijo mussarela	15	0 (0%)	0 (%)
Queijo prato	15	6 (40 %)	4 (26,6 %)
Queijo colonial	15	12 (80 %)	9 (60 %)
Total	45	18 (40,0 %)	13 (28,8 %)

* ECP acima de 10^3 UFC.g⁻¹ (RDC N°12, Brasil, 2001)

A análise de variância das médias de contaminação para ECP mostra que existe diferença significativa entre os tipos de queijo e o teste de homogeneidade de grupos LSD indica que o queijo tipo colonial é significativamente diferente dos demais, ao nível de 5% de significância. As médias das contagens de contaminação de ECP nas amostras com inspeção municipal, estadual e federal diferem significativamente, sendo que a contagem média de ECP dos produtos inspecionados pelo SIF é significativamente menor ($1,4 \times 10^3$ UFC.g⁻¹) que SIE e SIM ($1,5 \times 10^5$ e $1,7 \times 10^5$ UFC.g⁻¹ respectivamente).

Em seis amostras de queijo colonial, 33,3% do total de amostras positivas, os resultados para contagem para ECP estiveram acima de 10^5 UFC.g⁻¹. De acordo com

Carmo et al. (2002) e FDA (2007), em contagens acima desses valores é possível ocorrer a produção de enterotoxinas estafilocócicas no alimento, com a ocorrência de sintomas. A multiplicação de *S. aureus* em alimentos representa um perigo em potencial devido à existência de muitas linhagens produtoras de enterotoxinas, que causam intoxicação alimentar quando ingeridas (BOEREMA; CLEMENS; BRIGHTWELL, 2006; PELES et al., 2007).

Uma das principais fontes de contaminação por ECP em queijos tem origem nas mãos e nos antebraços dos manipuladores devido ao deficiente controle higiênico sanitário e ainda, a não utilização de luvas durante o processamento (ASSUMPÇÃO et al., 2003). Desta forma, a contaminação deve ser oriunda, provavelmente, da manipulação humana ou de matérias-primas procedentes de animais portadores (CUNHA et al., 2006).

Além disso, a qualidade microbiológica do queijo colonial também está relacionada a vários fatores, como por exemplo, a qualidade de matéria-prima, que é influenciada pela sanidade do rebanho e higiene na obtenção do leite; o beneficiamento, que envolve o preparo da matéria-prima, tratamento térmico, higienização dos equipamentos, manipulação e armazenamento e ainda, a distribuição do produto e conservação (ARAÚJO et al., 2002). Estes fatores associados à estocagem do produto em temperatura ambiente permitem o crescimento de *S. aureus* e *Staphylococcus* spp. e conseqüentemente a produção de enterotoxinas (ARAÚJO et al., 2002).

Buyser et al. (2001) realizaram uma estimativa do envolvimento de leite e derivados em doenças de origem alimentar na França e em diferentes países industrializados. Sete países indicaram que o leite e derivados estiverem envolvidos de 1 a 5% do total de surtos bacterianos e ainda, que o *S. aureus* foi o patógeno mais freqüentemente associado aos surtos (85%) seguido pela *Salmonella* (10,1%).

Com relação aos produtos derivados de carne, entre as 18 amostras de lingüiça colonial analisadas, 83,3% apresentaram ECP em concentrações que variaram de 4×10^2 a $1,8 \times 10^6$ UFC/g. Destas amostras, 9 estavam acima do limite estabelecido na Resolução RDC n.º 12 (BRASIL, 2001), que permite até 5×10^3 UFC/g em produtos cárneos maturados (Tabela 7) e em 6 delas, a contagem de ECP superou a concentração de 10^5 UFC/g, considerada de maior probabilidade para a produção de enterotoxinas, conforme discutido anteriormente.

Tabela 7 - Amostras de derivados de carne com estafilococos coagulase positiva

Alimentos	Número de amostras analisadas	Número de amostras ECP (%)	Amostras em desacordo com os parâmetros microbiológicos* (%)
Lingüiça colonial	18	15 (83,3%)	9 (50%)
Salaminho	09	0 (0%)	0 (0%)
Total	27	15 (55,5%)	9 (33,3%)

* ECP acima de 10^3 UFC.g⁻¹ (RDC N°12, Brasil, 2001)

Nas amostras de salaminho, os resultados mostraram ausência de contaminação por ECP (Tabela 7). Estes resultados são similares aos encontrados por outros autores, como Pereira (2006), que constatou boa qualidade dos salames industriais (milano e italiano).

Um estudo realizado no estado de São Paulo analisou a presença de *S. aureus* e coliformes a 45 °C em sobremesas, sanduíches, derivados de leite entre outros alimentos. *S. aureus* foi isolado em 26 amostras (15,1%) de 172 amostras, no entanto, 69 amostras (40,1%) estavam em desacordo com a legislação vigente para os parâmetros microbiológicos (ARAGON-ALEGRO et al., 2007)

Na Itália, Normanno et al., (2005) investigaram a presença de estafilococos coagulase positiva e *S. aureus* em vários alimentos (carne, hambúrguer, derivados de peixe, leite e derivados, sorvete, macarrão, etc.) Foram isoladas 1.971 linhagens de estafilococos coagulase positiva que levaram a identificação de 537 *S. aureus* testados quanto à capacidade de produção de enterotoxinas SEA, SEB, SEC e SED. Um total de 298 linhagens de *S. aureus* (55, 5%) produziu uma ou mais enterotoxinas.

2.5.2 Padronização dos protocolos de PCR

Para testar os iniciadores (MEHROTRA, WANG, JOHNSON, 2000) foram realizadas reações de PCR com os padrões ATCC 13565 (SEA), ATCC 14458 (SEB), ATCC 19095 (SEC) e ATCC 27664 (SEE). Os produtos da PCR multiplex mostraram que o protocolo 1 é eficaz para a detecção dos genes *sea*, *femA*, *seb* e *see* no entanto, não foi possível a detecção do gene *sec* (Figura 8A). O protocolo 2 foi eficiente na amplificação dos genes *femA* e *sec* (Figura 8B) e o o protocolo 3 para a detecção dos genes *sea*, *femA*, *seb*, *sed* e *see* (Figura 8C).

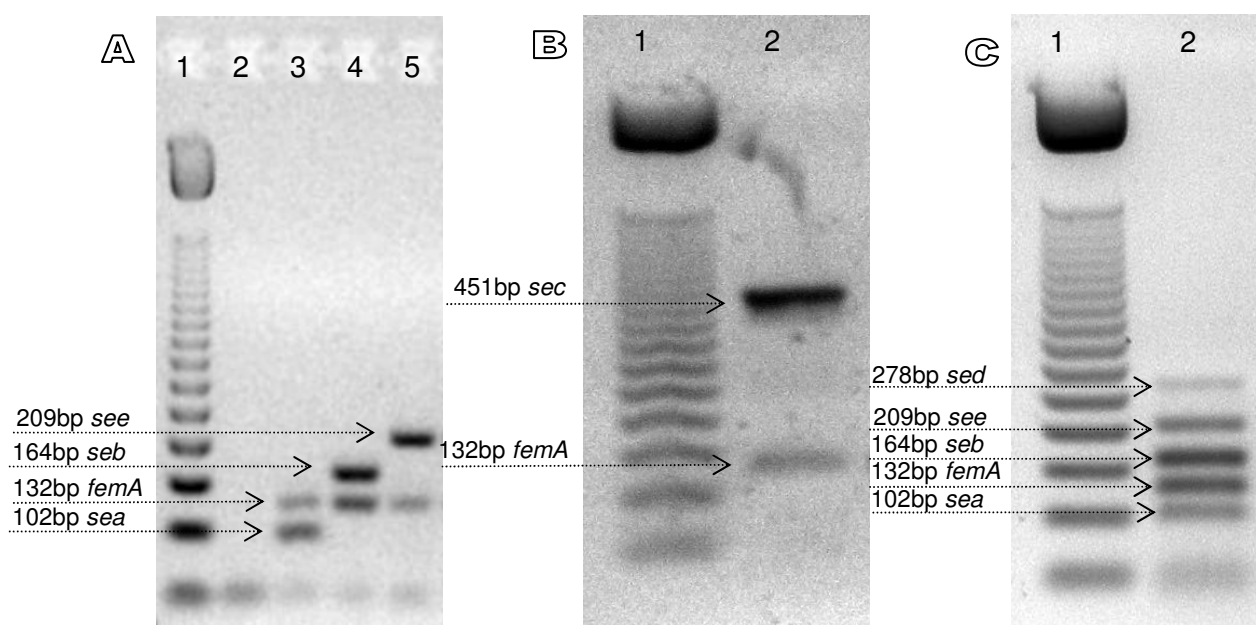


Figura 8 – Diferentes reações de PCR realizadas para amplificação dos genes alvos

A – PCR para detecção dos genes *sea*, *femA*, *seb*, *see* das linhagens ATCC de *Staphylococcus aureus*

Canaleta 1: padrão de pares de base de 50pb (Promega); canaleta 2: controle negativo (*Staphylococcus xylosus*); canaleta 3: ATCC 13565 (SEA); canaleta 4: ATCC 14458 (SEB); canaleta 5: ATCC 27664 (SEE); (10 μ L do produto da PCR + 2 μ L tampão de carga por canaleta)

B – PCR duplex para detecção dos genes *femA* e *sec* das linhagens ATCC de *Staphylococcus aureus*.

Canaleta 1: padrão de pares de base de 50pb (Promega); canaleta 2: ATCC 19095 (SEC); (12 μ L do produto da PCR + 2 μ L tampão de carga por canaleta)

C – PCR multiplex para detecção dos genes *sea*, *femA*, *seb*, *sed* e *see* das linhagens ATCC de *Staphylococcus aureus*.

Canaleta 1: padrão de pares de b ase de 50pb (Promega); canaleta 2: controles positivos (ATCC 13565 SEA, ATCC 14458 SEB, ATCC 23235 SED, ATCC 27664 SEE);

2.5.3 PCR multiplex para detecção de genes de enterotoxinas e *femA*

Das 200 cepas de *Staphylococcus* spp analisadas, 116 foram isoladas de queijos prato e colonial, e 84 de lingüiça colonial. Do total de isolados, 102 (51%) foram caracterizadas como *Staphylococcus aureus* através da prova de coagulase, semeaduras em meio de cultura Ágar MacConkey e Ágar Sangue, coloração de Gram, catalase, oxidase, urease e maltose, sendo 67 (80%) cepas isoladas a partir de lingüiça colonial e 35 (30,2%) de queijo prato e colonial. As 98 (49%) cepas restantes foram *Staphylococcus* spp. coagulase negativa (Tabela 8).

As cepas ECP foram analisadas através de PCR multiplex (protocolo 1, 2 e 3) para detecção do gene *femA* e para genes enterotoxigênicos *sea*, *seb*, *sec*, *sed* e *see*. De 102 isoladas ECP, obtivemos 91 (89%) cepas positivas para o gene *femA* e 11 cepas ECP isoladas de lingüiça colonial negativas para o gene *femA* específico de *S. aureus*. Obtivemos 10 cepas positivas para presença do gene *sea*, 12 cepas para o gene *sed* e quatro cepas para o gene *see* (Figura 9A e Tabela 8). Apenas três cepas isoladas de lingüiça colonial amplificaram simultaneamente dois genes enterotoxigênicos (*sea* e *see*).

O gene *femA* foi amplificado para todas as 35 cepas ECP isoladas de queijos, confirmando a caracterização bioquímica convencional. Destas cepas, a amplificação dos genes de enterotoxinas *sed* ocorreu em 11 (31,4%) cepas e do gene *see*, em uma (2,9%) (Figura 9A e Tabela 8). Nas cepas com amplificação do gene *sed*, também foi observada a amplificação de fragmentos com 600 e 700 pb (Figura 9A), resultados também encontrados por Cremonesi et al. (2005) para derivados de leite.

Para as 56 cepas ECP e *femA* positivas isoladas de lingüiça colonial, sete cepas amplificaram somente o gene *sea*, uma cepa, o gene *sed* e três cepas amplificaram os genes *sea* e *see* (Figura 9B e Tabela 8). Nenhuma cepa foi positiva para a amplificação dos genes *seb* e *sec*.

Assim como em nossos resultados, os genes das enterotoxinas *sea* e *sed* foram relatados como os mais freqüentes em alimentos por diversos autores (ARAGON-ALEGRO et al., 2007; ATANASSOVA; MEINDL; RING, 2001; BALABAN; RASOOLI, 2000; NÁJERA-SÁNCHEZ et al., 2003; PORTOCARRERO; NEWMAN; MIKEL, 2002).

Tabela 8- Presença de genes *femA*, *sea*, *seb*, *sec*, *sed* e *see* em linhagens de estafilococos coagulase positiva (ECP) isolados de alimentos

Alimento	Cepas isoladas	ECP	ECP <i>femA</i> positivo	ECP <i>sea</i> positivo	ECP <i>seb</i> positivo	ECP <i>sec</i> positivo	ECP <i>sed</i> positivo	ECP <i>see</i> positivo
Queijo prato e colonial	116	35	35	0	0	0	11	1
Lingüiça colonial	84	67	56	10	0	0	1	3*
Total	200	102	91	10	0	0	12	4

* Estas 3 cepas também apresentaram o gene para enterotoxina SEA

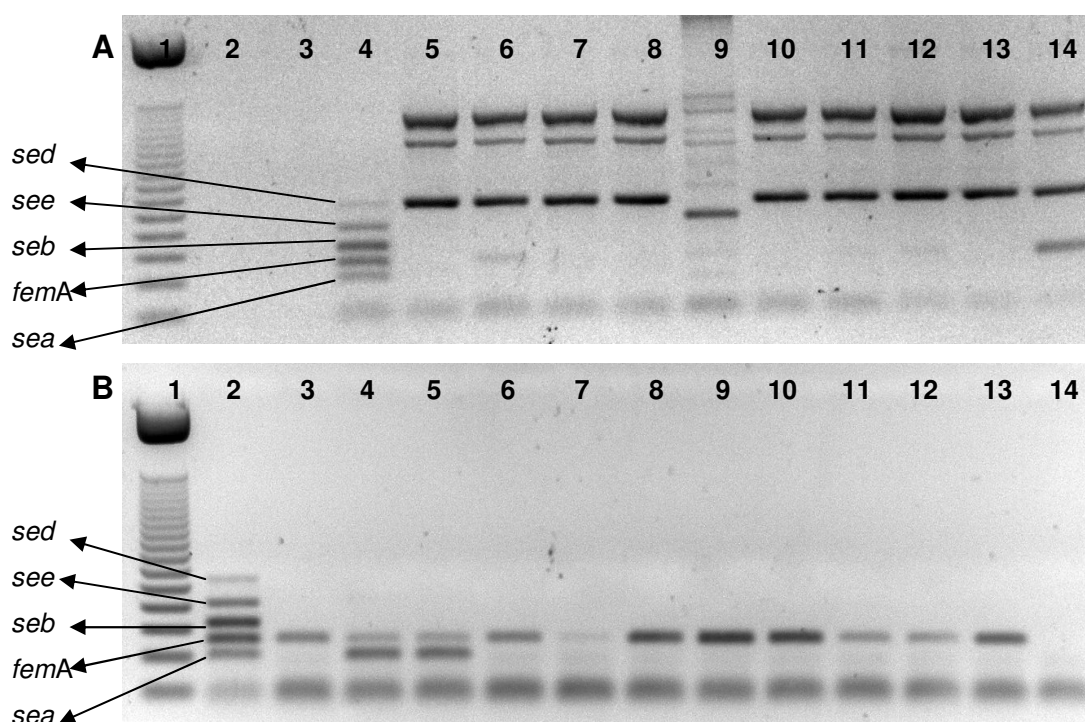


Figura 9 - PCR Multiplex de cepas ECP isoladas A) de queijo e B) de lingüiça colonial

A) Canaleta 1: padrão de pares de base de 50pb (Promega); canaleta 2: água destilada; canaleta 3: controle negativo ATCC 29971 *Staphylococcus xylosus*; canaleta 4: controle positivo mistura de 4 ATCC (13565 SEA, 14458 SEB, 23235 SED, 27664 SEE); canaletas 5 – 14: colônias de *S. aureus* isoladas de queijo.

B) Canaleta 1: padrão de pares de base de 50pb (Promega); canaleta 2: controles positivos (ATCC 13565 SEA, ATCC 14458 SEB, ATCC 23235 SED, ATCC 27664 SEE); canaletas 3 - 13: colônias de *S. aureus* isoladas de lingüiça colonial; canaleta 14: controle negativo *Staphylococcus xylosus*.

Carmo et al. (2002) analisaram amostras de queijo minas frescal e leite cru suspeitos de causarem dois surtos alimentares em Minas Gerais e detectaram a produção das enterotoxinas SEA, SEB e SEC. No leite cru foi identificada a presença de estafilococos coagulase negativa com contagens acima de $2,0 \times 10^8$ UFC.g⁻¹ e detectaram a produção das enterotoxinas SEC e SED. Borelli et al (2006) analisaram o queijo produzido na Serra da Canastra, MG, e encontraram a presença de *S. aureus* acima de 10^5 UFC.g⁻¹ e as cepas produtoras de enterotoxinas SEB e SEC foram as encontradas com maior frequência.

A identificação dos tipos de enterotoxinas produzidas pelos *Staphylococcus* spp. é importante pois através delas é possível determinar a origem da contaminação do alimento. As enterotoxinas SEA e SEB têm sido associadas com contaminação envolvendo manipuladores de alimentos, já as enterotoxinas SEC e SED estão relacionadas com contaminação de origem animal, principalmente bovinos e suínos (NÁJERA-SÁNCHEZ et al., 2003).

Em nosso trabalho, os genes que codificam as enterotoxinas estafilocócicas SEA, SED e SEE foram observados nas cepas ECP isoladas de queijo e lingüiça colonial. O gene *sed* foi o mais freqüente em amostras de queijo, sugerindo contaminação de origem animal e o gene *sea* foi o mais freqüente em amostras de lingüiça colonial, sugerindo contaminação de origem humana. Nossos resultados sugerem que os produtos analisados podem conter as enterotoxinas SEA, SED e SEE e apontam a necessidade de melhoria na produção e nos sistemas de fiscalização estadual e municipal dos produtos analisados.

As possíveis causas da contaminação dos alimentos por *Staphylococcus* spp. estão relacionadas com as condições insatisfatórias dos utensílios, a manipulação inadequada durante o processamento, a utilização de leite sem pasteurização para produção de queijos, pelo pequeno produtor e a falta de controle da temperatura da matéria-prima durante o transporte e processamento (ALMEIDA FILHO; NADER FILHO, 2002; ARAÚJO et al., 2002; CARMO et al., 2002; LOGUÉRCIO; ALEIXO, 2001) O controle da temperatura é fundamental para obtenção de produtos com qualidade microbiológica, segundo Araújo et al. (2002) o armazenamento de queijo minas frescal, sob elevada temperatura ambiental, permite o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus* spp. podendo estimular a produção de enterotoxinas estafilocócicas nos alimentos. Toshkova et al. (2001) e Vautor et al. (2005) analisaram a relação dos

portadores assintomáticos de *Staphylococcus aureus* com a ocorrência de infecções estafilocócicas. Eles concluíram que os portadores têm um importante papel na manutenção e na disseminação desses microrganismos, especialmente os profissionais da área da saúde e os manipuladores de alimentos.

Além disso, a adição de culturas iniciadoras, no processamento de queijos e lingüiça contribuem para controlar o desenvolvimento de microrganismos deteriorantes e patogênicos. Entretanto, quando essas culturas não funcionam apropriadamente ou quando ainda não produziram ácido láctico suficiente, esse controle não ocorre (CARMO et al., 2002; MARTÍN at al., 2005; MARTINS, 2006).

2.6 CONCLUSÕES

A presença de estafilococos coagulase positiva foi detectada em amostras de queijo prato, queijo colonial e lingüiça colonial com contagens acima do valor máximo permitido pela legislação.

Foram amplificados genes que codificam para as enterotoxinas SEA, SED e SEE e o gene específico para *Staphylococcus aureus* (*femA*) a partir de ECP isolados de alimentos.

Os resultados do presente trabalho confirmam que a PCR multiplex é um método rápido e sensível para análise de varredura de *Staphylococcus* coagulase positiva enterotoxigênico, sendo altamente específica.

Este trabalho sugere que os produtos analisados podem conter as enterotoxinas SEA, SED e SEE e aponta a necessidade de melhoria na produção e nos sistemas de fiscalização dos produtos analisados.

2.7 REFERÊNCIAS

- ABE J.; ITO, Y.; ONIMARU, M. ; KOHSAKA, T.;TAKEDA, T. Characterization and distribution of a new enterotoxin-related superantigen produced by *Staphylococcus aureus*. **Microbiology and Immunology**, v. 44, p. 79-88, 2000.
- ADESIYUM, A.A.; WEBB, L.A.; ROMAIN, H.T. Prevalence and characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bulk and composite milk and cattle handlers. **Journal of Food Protection**, v. 61, p. 629–632, 1998.
- ADWAN, G.; ABU-SHANAB, B. ADWAN, K. Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in Raw Milk in the North of Palestine. **Journal of Biology**, v. 29, p. 229-232, 2005.
- ALMEIDA FILHO, E.S.; NADER FILHO, A. Ocorrência de *Staphylococcus aureus* em queijo tipo “frescal”. **Revista de Saúde Pública**, n. 34, v. 6, p. 578-80, 2000
- ANUNCIAÇÃO, L.L.C.;LINARDI, W.R.; CARMO, L.S.; BERGDOLL, M.S. Production of staphylococcal enterotoxin A in white cheese. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.25, p. 68–71,1994.
- ARAGON-ALEGRO, L. C.; KONTA, E. M.;SUZUKI, K; SILVA, M. G.; FERNANDES JÚNIOR, A.; RAAL, R.; RALL, V. L. M. Occurrence of coagulase-positive *Staphylococcus* in various food products commercialized in Botucatu, SP, Brazil and detection of toxins from food and isolated strains. **Food Control**, v.18, p.630-634, 2007.
- ARAÚJO, V.S.; PAGLIARES, V. A.; QUEIROZ, M. L. P. ; FREITAS-ALMEIDA, A. C. Occurrence of *Staphylococcus* and enteropathogens in soft cheese commercialized in the city of Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, v.92, n.6, p.1172-1177, 2002.
- ARNAU,J.; SERRA, X.; J. COMAPOSADA, J.; P. GOU, P. ; M. GARRIGA, M. Technologies to shorten the drying period of dry-cured meat products. **Meat Science**, v. 77, p. 81–89, 2007.
- ASSUMPÇÃO, E. G.; PICCOLI-VALLI, R. H.; HIRSCH, D.; A BREU, L. R. Fontes de contaminação por *Staphylococcus aureus* na linha de processamento de queijo prato. **Arquivos Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 55, n.3, p.366-370, 2003.
- ATANASSOVA, V.; MEINDL, A.; RING, C. Prevalence of *Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxins in raw pork and uncooked smoked ham—acomparison of classical culturing detection and RFLP-PCR. **International Journal of Food Microbiology** , v. 68, p. 105–113, 2001.
- ÁVILA, J.S.; BRATZ, W.R.; VILELA, M.A.P.; REZENDE, P.R. Queijo “Minas Frescal” comercializado na cidade de Juiz de Fora e região III – Incidência de estafilococos produtores de coagulase. **Revista do Instituto de Laticínio “Cândido Tostes”**, n. 333, p. 115-121, 2003.

- BALABAN, N. ; RASOOLY, A. Review staphylococcal enterotoxins. **International Journal of Food Microbiology**, v. 61, p. 1-10, 2000
- BALABAN, N.; RASOOLY, A. Analytical chromatography for recovery of small amounts of staphylococcal enterotoxins from food. **International Journal of Food Microbiology**, v. 64, p. 33–40, 2001.
- BALBANI, A. P. S.; BUTUGAN, O. Contaminação biológica de alimentos. **Pediatria**, v. 23, n.4, p.320-328, 2001.
- BLAIOTTA, G.; ERCOLINI, D.; PENNACCHIA, C.; FUSCO, V. ; CASABURI, A.; PEPE O.; VILLANI, F. PCR detection of staphylococcal enterotoxin genes in *Staphylococcus* spp. strains isolated from meat and dairy products. Evidence for new variants of seG and sel in *S. aureus* AB-8802. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, p. 719–730, 2004.
- BACHERT, C.; GEVAERT, P.; VAN CAUWENBERGE, P. *Staphylococcus aureus* enterotoxins: a key in airway disease? **Allergy**, v. 57, p.480–487, 2002.
- BECKER, K.; FRIEDRICH, A. W.; LUBRITZ, G.; WEILERT, M.;PETERS, G.; VON EIFF, C. V. Prevalence of Genes Encoding Pyrogenic Toxin Superantigens and Exfoliative Toxins among Strains of *Staphylococcus aureus* Isolated from Blood and Nasal Specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, n.4, p.1434–1439, 2003.
- BENSON, T. E.; PRINCE, D. B.; MUTCHLER, V. T.; CURRY, K. A.;HO, A. M.; SARVER, R. W.; HAGADORN, J. C.;CHOI, G. H.; GARLICK, R. L. X-Ray Crystal Structure of *Staphylococcus aureus* FemA. **Structure**, v.10, p.1107–1115, 2002.
- BOEREMA, J.A.; CLEMENS, R.; BRIGHTWELL, G. Evaluation of molecular methods to determine enterotoxigenic status and molecular genotype of bovine, ovine, human and food isolates of *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Food Microbiology**, v.107, p. 192–201, 2006.
- BORELLI, B. M. ; FERREIRA, E. G. ; LACERDA, I. C. A.; SANTOS, D. A.; CARMO, L. S.; DIAS, R. S.;SILVA, M. C. C.; ROSA, C. A. Enterotoxigenic *Staphylococcus* spp. and other microbial contaminants during production of canastra cheese, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 545-550, 2006.
- BERGDOLL, M.S. Analytical methods for *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Food Microbiology**, v.10, p.91-100,1990.
- BONFOH, B. ; WASEM, A.; TRAORÉ, A. N. ; FANÉ, A. ; SPILLMANN, H.; SIMBÉ, C. F.; ALFAROUKH, I. O.; NICOLET, J. ; FARAH, Z.; ZINSSTAG, J. Microbiological quality of cow's milk taken at different intervals from the udder to selling point in Bamako (Mali). **Food Control**, v.14, n.7, p. 495-500, 2003.

BORGES, M. F.; SIQUEIRA, R. S. de; BITTENCOURT, A. M. ; VANETTI, M. C. D.; GOMIDE, L. A. M. Occurrence de *Listeria monocytogenes* in salami. **Revista de Microbiologia**, v. 30, n. 4, p.362-64, 1999.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Portaria nº 364, de 04 de setembro de 1997. **Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Queijo Mozzarella (Muzzarella ou Mussarella)**. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis>-Acesso em 03 jul. 2007

BRASIL. Ministério da Agricultura. Instrução normativa n. 22, de 31 de julho de 2000. **Regulamento técnico de identidade e qualidade da linguagem colonial** . Diário Oficial da União, Brasília, DF, de 03 de agosto de 2000. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=2239>. Acesso em 03 jul. 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Instrução Normativa Nº 4, DE 01 DE MARÇO DE 2004. **Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade do queijo minas frescal**. Diário Oficial da União, Brasília, DF, de 05 de março de 2004. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=5974>. Acesso em 03 jul. 2007.

BUYSER, M.L. de; DUFOUR, B. ; MAIRE, M. ; LAFARGE, V. Implication of milk and milk products in food-borne diseases in France and in different industrialised countries. **International Journal of Food Microbiology**, v. 67, p.1–17, 2001.

CAMPAGNOL, P. C. B. ; FRIES, L. L. M. ; TERRA, N. N. Considerações na elaboração de salames. **Revista Nacional da Carne**, n. 362, abr., 2007.

CARMO, L.S. AND BERGDOLL, M.S. Staphylococcal food poisoning in Belo Horizonte (Brazil). **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 21, p.320–323, 1990.

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

CASTRO, L. C.; LUCHESE, R. H.; MARTINS, J. F. P. Efeito do uso da cepa starter de *Penicillium nalgiovense* na qualidade de salames. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 20, n. 1, p. 40-46, 2000

CHAPAVAL, L.; MOON, D.H.; GOMES, J.E.; DUARTE, F.R.; TSAI, S. M. Use of pcr to detect classical enterotoxins genes (ent) and toxic shock syndrome toxin-1 gene (tst) in *Staphylococcus aureus* isolated from crude milk and determination of toxin productivities of *S. aureus* isolates harboring these genes. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.73, n.2, p.165-169, abr./jun., 2006

- CHYE, F. Y.; ABDULLAH, A.; AYOB, M. K. Bacteriological quality and safety of raw milk in Malaysia. **Food Microbiology**, v. 21, n. 5, p.535-541, 2004.
- CUNHA, M. de L. R. de S. da; PERESI, E.; CALSOLARI, R. A.; ARAÚJO JÚNIOR, J. P. Detection of enterotoxins genes in coagulase-negative *Staphylococci* isolated from foods. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 70-74, 2006.
- CUNHA NETO, A. de ; SILVA, C. G. M. da; STAMFORD, T. L. M. *Staphylococcus* enterotoxigênicos em alimentos in natura e processados no estado de Pernambuco, Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 22, n. 3 p.263-275, 2002.
- DOWNES, F. P. ; ITO, K. (eds.) **Compendium of methods for the microbiological examination of food**. 4.ed. Washington: DC: APHA Press, 2001, 676p
- ERCOLINI, D., BLAIOTTA, G., FUSCO, V. AND COPPOLA, S. PCR-based detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in the early stages of raw milk cheese making. **Journal of Applied Microbiology**, v. 6, p.1090-1096, 2004.
- FERNÁNDEZ, M.; ORDÓÑEZ, J. A.; BRUNA, J. M.; HERRANZ, B.; HOLT, L. Accelerated ripening of dry fermented sausages. **Food Science & Technology**, v.11, p. 201-209, 2001.
- FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Foodborne pathogenic microorganisms and Natural Toxins Handbook** : *Staphylococcus aureus*. Disponível em: <http://www.cfsan.fda.gov>. Acesso em: 12 de jul. 2007.
- FUEYO, J.M.; MARTIN, M.C.; GONZALEZ-HEVIA, M.A.; MENDOZA, M.C. Enterotoxin production and DNA fingerprinting in *Staphylococcus aureus* isolated from human and food samples. Relations between genetic types and enterotoxins. International. **Journal of Food Microbiology**, v. 67, p.139–145, 2001.
- HECKER M.; ENGELMANN, S.; CORDWELL, S. J. Proteomics of *Staphylococcus aureus*- current state and future challenges. **Journal of Chromatography B**, v. 787 p.179–195, 2003.
- HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P.H. A.; STALEY, J. T.; WILLIAMS, S. T. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9.ed. Baltimore : Williams & Wilkins, 1994.
- HOFFMAN, L. F.; GARCIA-CRUZ, H. C.; VINTURIM, M. T. Estudo higiênico-sanitário preliminar de amostras de salame. **Higiene Alimentar**, v.11, n.47, p.42-44, 1997.
- HWANG, S. Y.; KIM, S. Y.; JANG, E. J.; KWON ,N. H.; PARK, Y. K.; KOO, H. C.;JUNG, W. K.; KIM, J. M.; PARK, Y. H. Novel multiplex PCR for the detection of the *Staphylococcus aureus* superantigen and its application to raw meat isolates in Korea. **International Journal of Food Microbiology** , v. 117, p. 99-105, 2007.

- IDE, L. P. A.; BENEDET, H. D. Contribuição ao conhecimento do queijo colonial produzido na região serrana do estado de Santa Catarina, Brasil. **Ciência e Agrotecnologia**, v.25, n.6, p.1351-1358, nov./dez., 2001.
- IKEDA, T.; TAMATE, N.; YAMAGUCHI, K.; MAKINO, S. Mass Outbreak of Food Poisoning Disease Caused by Small Amounts of Staphylococcal Enterotoxins A and H, **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, n.5, p. 2793–2795, 2005.
- JARRAUD, S.; PEYRAT, M. A.; LIM, A.; TRISTAN, A.; BES, M.; MOUGEL, C.; ETIENNE, J.; VANDENESCH, F.; BONNEVILLE, M.; LINA, G. egc, A Highly Prevalent Operon of Enterotoxin Gene, Forms a Putative Nursery of Superantigens in *Staphylococcus aureus* **Journal of Immunology**, v.166, p. 669-677, 2001.
- JAY, J. M. **Microbiología de alimentos**. Traduzido por Eduardo César Tondo... 6.ed. Porto Alegre : Artmed, 2005. 711p.
- JORGENSEN, H.J.; MATHISEN, T.; LOVSETH, A.; OMOE, K.; QVALE, K.S.; LONCAREVIC, S. An outbreak of staphylococcal food poisoning caused by enterotoxin H in mashed potato made with raw milk. **FEMS Microbiology Letters**, v. 252, p.267–272, 2005
- KLEIN, C. S.; ZOTTI, T. R.; GAVA, A.; PELISSER, M. R. Qualidade Microbiológica de Salames tipo Colonial Comercializados na Cidade de Concórdia-SC: análise de *Staphylococcus aureus* e *Toxoplasma gondii*. **Comunicado Técnico** n. 446. EMBRAPA : Concórdia, 6p., 2006.
- LAMAITA, H.C.; CERQUEIRA, M.M.O.P.; CARMO, L. S.; SANTOS, D.A.; PENNA, C.F.A.M.; SOUZA, M.R. Contagem de *Staphylococcus* sp. e detecção de enterotoxinas estafilocócicas e toxina da síndrome do choque tóxico em amostras de leite cru refrigerado. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.57, n.5, p.702-709, 2005.
- LANCETTE, G. A.; BENNETT, R. W. *Staphylococcus aureus* and Staphylococcal enterotoxins IN: AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION – APHA. **Compendium of methods for the microbiological examination of food**. 4.ed. Washington, DC: APHA Press. cap.39, p. 387-402, 2001.
- LE LOIR, Y.; BARON, F.; GAUTIER, M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. **Genetics Molecular Research**, v.2, n.1, p. 63-76, 2003.
- LEROY, F.; VERLUYTEN, J.; VUYST, L. D. Functional meat starter cultures for improved sausage fermentation, **International Journal of Food Microbiology**, v. 106, p. 270-285, 2006.
- LETERTRE, C.; PERELLE, S.; DILASSER, F.; FACH, P. Identification of a new putative enterotoxin SEU encoded by the egc cluster of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Applied Microbiology**, v.95, p. 38–43, 2003

- LOBO, M. de V. *et al.* Avaliação microbiológica de salames coloniais comercializados no município de Santa Maria – RS. **Higiene alimentar**, São Paulo, v. 15, n. 88, p. 57-61, set. 2001.
- LOGUERCIO, A.P.; ALEIXO, J.A.G. Microbiologia de queijo Minas Frescal produzido artesanalmente. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.31, n.6, p.1063-1067, 2001.
- MAGNANI, A. L.; GIOMBELLI, A.; SHUCK, M. S.; BUSATO, M. A.; SILVA, N. L. Incidência de *Salmonella* e *Escherichia coli* em carne suína in natura e salame colonial, consumidos pela população de Chapecó – SC. **Higiene Alimentar**, v.14 n. 73, p. 44-47, jun. 2000
- MALORNY, B.; TASSIOS, P. T; PETER RADSTRÖM, P. ; COOK, N. ; WAGNER, M.; HOORFAR, J. Standardization of diagnostic PCR for the detection of foodborne pathogens. **International Journal of Food Microbiology**, v. 83, p. 39– 48, 2003.
- MAMPRIM FILHO, A. **Pesquisa de genes responsáveis pela produção de enterotoxinas a partir de cepas de *Staphylococcus coagulase negativa e positiva* isoladas das fossas nasais e mãos de manipuladores de alimentos.** 2006, 1v. 73p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. Botucatu – SP
- MARQUES, S. C; REZENDE, J. DAS G. O. S.; ALVES, L. A. DE F.; SILVA, B. C.; ALVES, E.; ABREU, L. R. DE; PICCOLI, R. H. Formation of biofilms by *Staphylococcus aureus* on stainless steel and glass surfaces and its resistance to some selected chemical sanitizers. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 538-543, 2007.
- MARTÍN, B.; GARRIGA, M.; HUGAS, M.; BOVER-CID, S.; VECIANA-NOGUÉS, M.T.; AYMERICH, T. Molecular, technological and safety characterization of Gram-positive catalase-positive cocci from slightly fermented sausages. **International Journal Food Microbiology**, v. 107, n. 2, p.148-158, 2005.
- MARTÍN, M. C; GONZÁLEZ-HEVIA, M. A.; MENDOZA, M.C. Usefulness of a two-step PCR procedure for detection and identification of enterotoxigenic staphylococci of bacterial isolates and food samples. **Food Microbiology**, v. 20, p. 605–610, 2003.
- MARTINS, C. A. DE P.; KOGA-ITO, C. Y.; JORGE, A. O. C. Presence of *Saphylococcus* spp. and *Candida* spp. in the human oral cavity. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.33, p.236-240, 2002.
- MARTINS, R. Produção de embutidos crus-curados (salame). Dossiê Técnico, Serviço Brasileiro de Respostas Técnicas – SBRT, 2006
- MEHROTRA, M.; WANG, G.; JOHNSON, W. M. Multiplex PCR for Detection of Genes for *Staphylococcus aureus* Enterotoxins, Exfoliative Toxins, Toxic Shock Syndrome Toxin 1, and Methicillin Resistance. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 3, p.1032–1035, 2000.

- MELO, G. B.; MELO, M. C.; GAMA, A. P.; CARVALHO, K. S.; JESUS, T. C.; BONETTI, A. M.; GONTIJO FILHO, P. P. Analysis of the genetic diversity of vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.36, p. 126-130, 2005.
- MORANDI, S.; BRASCA, M.; LODI, R.; CREMONESI, P.; CASTIGLIONI, B. Detection of classical enterotoxins and identification of enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* from milk and dairy products. **Veterinary Microbiology**, v. 124, p. 66–72, 2007.
- NÁJERA-SÁNCHEZ, G.; MALDONADO-RODRÍGUEZ, R.; OLVERA, P. R.; GARZA, L. M. de La. Development of two multiplex polymerase chain reaction for the detection of enterotoxigenic strains of *Staphylococcus aureus* isolated from foods. **Journal of Food protection**, v.66, n.6, p. 1055-1062, 2003.
- NASCIMENTO, M. G. F.; CORBIA, A. C. G.; NASCIMENTO, E. R. Limitações da técnica de isolamento e enumeração de *Staphylococcus aureus*. Rio de Janeiro ; Embrapa Agroindústria de Alimentos. **Comunicado Técnico**, n. 45, dez, 4 p. 2001.
- NEMA, V.; AGRAWAL, R.; KAMBOJ, D. V.; GOEL, A. K.; SINGH, L. Isolation and characterization of heat resistant enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* from a food poisoning outbreak in Indian subcontinent. **International Journal of Food Microbiology**, v. 117, p. 29–35, 2007.
- NORMANNO, G.; FIRINU, A.; VIRGILIO, S.; MULA, G.; DAMBROSIO, A.; POGGIU, A.; DECASTELLI, L.; MIONI, R.; SCUOTA, S.; BOLZONI, G.; DI GIANNATALE, E.; SALINETTI, A.P.; LA SALANDRA, G.; BARTOLI, M.; ZUCCON, F.; PIRINO, T.; SIAS, S.; PARISI, A.; QUAGLIA, N.C.; CELANO, G.V. Coagulase-positive staphylococci and *Staphylococcus aureus* in food products marketed in Italy. **International Journal of Food Microbiology**, v. 98, p.73–79. 2005
- NORMANNO, G.; LA SALANDRA, G.; DAMBROSIO, A.; QUAGLIA, N.C.; CORRENTE, M.; PARISI, A.; SANTAGADA, G.; FIRINU, A.; CRISSETTI, E.; CELANO, G. V. Occurrence, characterization and antimicrobial resistance of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from meat and dairy products. **International Journal of Food Microbiology**, v.115, p. 290–296, 2007.
- OMOE, K.; ISHIKAWA, M.; SHIMODA, Y.; HU, D. L.;UEDA, S.; SHINAGAWA, K. Detection of seg, seh, and sei genes in *Staphylococcus aureus* Isolates and Determination of the Enterotoxin Productivities of *S. aureus* Isolates Harboring seg, seh, or sei Genes. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, n.3, p. 857–862, 2002.
- ORWIN, P. M.; LEUNG, D. Y. M.; DONAHUE, H. L.; NOVICK, R. P.; SCHLIEVERT, P. M. Biochemical and Biological Properties of Staphylococcal Enterotoxin K. **Infection and Immunity**, v. 69, n.1, p. 360–366, 2001.
- ORWIN, P. M.; FITZGERALD, R. J.; LEUNG, D. Y. M.; GUTIERREZ, J. A.; BOHACH, G. A.; SCHLIEVERT, P. M. Characterization of *Staphylococcus aureus* Enterotoxin L. **Infection and Immunity**, v. 71, n.5, p. 2916–2919, 2003.

- OLIVEIRA, M. J.; ARAÚJO, W. M. C.; BORGIO, L. A. Quantificação de nitrato e nitrito em lingüiça do tipo frescal. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 4, p.732-742, 2005.
- ORDÓÑEZ, J. A. ; RODRÍGUEZ, M. I. C. ; ÁLVAREZ, L. F.; SANZ, M. L.G.; MINGUILLÓN, G. D. G. F.; PERALES, L. H.; CORTECERO, M. D. S. **Tecnología de alimentos** : alimentos de origem animal. v.2. Porto Alegre: Artmed, 2005. 279 p.
- PELES, F.; WAGNER, M.; VARG, L.; HEIN, I.; RIECK, P.; GUTSER K.; KERESZTÚRI, P.; KARDOS, G.; TURCSÁNYI, I.; BÉRI, B.; SZABÓ, A Characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine milk in Hungary. **International Journal of Food Microbiology**, v. 118, p. 186–193, 2007.
- PERAZOLLI, G. P.; GELINSKI, J. M. L. N. Qualidade higiênico-sanitária de salame artesanal elaborados por produtores rurais do município de Arroio Trinta-SC. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA E ALIMENTOS, XX, 2006, Curitiba. **Anais Alimentos e Agroindústrias Brasileiras no Contexto Internacional**. São Paulo: TecArt, 2006.
- PEREIRA, k. S. Levantamento sobre a qualidade microbiológica de salames brasileiros. **Revista Nacional da Carne**, n.362, abr., 2007.
- PORTOCARRERO, S. M.; NEWMAN, M.; MIKEL, B. *Staphylococcus aureus* survival, staphylococcal enterotoxin production and shelf stability of country-cured hams manufactured under diVerent processing procedures. **Meat Science**, v.62, p.267–273, 2002.
- RAPINI, L.S.; CERQUEIRA, M.M.O.P. ; CARMO, L.S.; VERAS,J.F; SOUZA, M.R. Presença de *Staphylococcus* spp. produtores de enterotoxinas e da toxina da síndrome do choque tóxico em manipuladores de queijo de cabra. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.57, n.6, p.825-829, 2005.
- RIJPENS, N. P.; HERMAN, L. M. F. Molecular methods for identification and detection of bacterial food pathogens. **Journal of AOAC International**, v.85, n.4, p.984-995, 2002.
- RITTER, R.; SANTOS, D.; AGOSTINI, F. S.; CARBONI, A. R.; BERGMANN, G. P. Microbiologia contaminante e patogênica de lingüiça (salame) colonial, analisada em quatro períodos distintos. **Higiene alimentar**, v. 17, n. 113, p. 60-66, out. 2003.
- RODRÍGUES-LÁZARO, D.; LOMBARD, B.; SMITHD, H.; RZEUZTKAE, A.; D’GOSTINO, M.; HELMUTH, R.; SCHROETER, A.; MALORNY, B.; MIKO, A.; GUERRA, B.; DAVISON, J.; KOBILINSKY, A.; HERNÁNDEZ, M.; BERTHEAU, Y.; COOK, N. Trends in analytical methodology in food safety and quality: monitoring microorganisms and genetically modified organisms. **Trends in Food Science & Technology**, v.18, p. 306-319, 2007.

- ROOS, T. B.; SCHEID FILHO, V. B.; TIMM, C. D.; OLIVEIRA, D. S. Avaliação microbiológica de queijo colonial produzido na cidade de Três Passos. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 19, n. 132, p. 94-96, 2005.
- ROUSTAN, L. J.; CHU, A. R.; MOULIN, G.; BIGEY, F. A novel lipase/acyltransferase from the yeast *Candida albicans*: expression and characterisation of the recombinant enzyme. **Applied Microbiology Biotechnology**, n. 68, p. 203–212, 2005.
- RIYAZ-UL-HASSAN, S.; VERMA, V.; QAZI, G. N. Evaluation of three different molecular markers for the detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction. **Food Microbiology**, v.25, p.452–459, 2008.
- SANT'ANA, A. de S.; AZEREDO, D. R. P. Comparação entre o sistema Petrifilm RSA e a metodologia convencional para a enumeração de *Estafilococos* coagulase positiva em alimentos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n.3, p. 531-535, 2005.
- SATCHER, D. Food safety: a growing global health problem. **Journal of the American Medical Association**, v. 283, p.1817- 1827, 2000.
- SETTANNI, L.; CORSETTI, A. The use of multiplex PCR to detect and differentiate food- and beverage-associated microorganisms: A review. **Journal of Microbiological Methods**, v. 69, p.1–22, 2007.
- SILVA, W. P.; GANDRA, E. A.; DUVAL, E. H.; JANTZEN, M. M.; TESSMANN, C.; LIMA, A. S. Qualidade microbiológica de lingüiças mistas do tipo frescal produzidas na cidade de pelotas (RS). **Boletim CEPPA** Curitiba, v. 20, n.2 p. 257-267 jul/dez, 2002
- SILVA, W. P. DA ; SILVA, J. A.; MACEDO, M. R. P. de; ARAÚJO, M. R. de A.; MATA, M. M.; GANDRA, E. A. Identification of *Staphylococcus aureus*, *S. intermedius* and *S. hyicus* by PCR amplification of *coa* and *nuc* genes, **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34 (Suppl.1), p.125-127, 2003.
- SORIANO, J. M.; FONT, G.; MOLTÓ, J. C; MAÑES, J. Enterotoxigenic staphylococci and their toxins in restaurant foods. **Trends in Food & Technology**, v.13, p.60-67, 2002.
- SOUZA, M. V.; REIS, C.; PIMENTA, F. C. Revisão sobre a aquisição gradual de resistência de *staphylococcus aureus* aos antimicrobianos. **Revista de Patologia Tropical**, v.34, n.1, p.27-36, 2005.
- STROHL, W. A.; ROUSE, H.; FISHER, B. D. **Microbiologia ilustrada**. Porto Alegre : Artmed, 2004. 531p.
- SU, Y.C.; Wong, A.C. Identification and purification of a new staphylococcal enterotoxin, H. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, p.1438–1443, 1995.
- TAUXE, R. V. Emerging foodborne pathogens. **International Journal of Food Microbiological**, v. 78, p.31-41, 2002

- TERRA, N. N. **Particularidades na fabricação de salame**. In: SHIMOKOMAKI, M.; OLIVO, R.; TERRA, N. N.; FRANCO, B. D. G. de M. *Atualidades em Ciência e tecnologia de carne*. São Paulo : Varela, 2006.
- TORTORA, G. J. ; FUNKE, B. R. ; CASE, C. L. **Microbiologia**. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2000. 827p.
- TOSHKOVA, K.; ANNEMULLER C.; AKINEDEN, O.; LAMMLER, C. The signicance of nasal carriage of *Staphylococcus aureus* as risk factor for human skin infections. **FEMS Microbiology Letters**, v. 202, p. 17-24, 2001.
- VANNUFFEL P.; GIGI J.; EZZEDINE H.;VANDERCAM B.; DELMEE M.; WAUTERS G.; GALA J.L. Especific detection of methicillin-resistant *Staphylococcus* species by multiplex PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, n. 33, p.2864-2867, 1995.
- VERAS, J. F.; CARMO, L. S. do; TONG, L. C.; SHUPP, J. W.; CUMMINGS, C.; SANTOS, D. A. dos; CERQUEIRA, M. M. O. P.; CANTINI, A.; NICOLI, J. R.; JETT, M. A study of the enterotoxigenicity of coagulase-negative and coagulase-positive staphylococcal isolates from food poisoning outbreaks in Minas Gerais, Brazil. **International Journal of Infectious Diseases**,v.12, n.4, p.410-415, 2008.
- VIEIRA-DA-MOTTA, O.; 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 Journal of Microbiology**, v. 32, p. 27-31, 2001.
- VIOTT, A.; STOLBERG, J.; PELISSER, M. R. Qualidade microbiológica e físico-química de salames tipo coloniais da região do Alto Uruguai Catarinense. **Higiene Alimentar**, v.20, n.138, p.78 jan.-fev. 2006.
- VAUTOR, E.; ABADIE, G.; GUIBERT, J. M.; CHEVALIER, N.; PÉPIN, M. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* in dairy sheep. **Veterinary Microbiology**, v. 106 p. 235–239, 2005.
- WORLD HEALT ORGANIZATION. Food safety and foodborne illness. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs237/en/>. Acesso em: 14 de out. 2007.
- ZHANG, X.; KONG, B.; XIONG, Y. L. Production of cured meat color in nitrite-free Harbin red sausage by *Lactobacillus fermentum* fermentation. **Meat Science**, v.77, n.4, p. 593-598, 2007.

ANEXOS

E) Ocurrence of *Staphylococcus aureus* and multiplex PCR detection of classic enterotoxin genes in cheese and meat products

Brazilian Journal of Microbiology (aceite)

OCURRENCE OF *Staphylococcus aureus* AND MULTIPLEX PCR DETECTION OF CLASSIC ENTEROTOXIN GENES IN CHEESE AND MEAT PRODUCTS

MARCIA REGINA PELISSER^{1,2}, CÁTIA SILENE KLEIN³, KELEN REGINA ASCOLI³, THAÍS REGINA ZOTTI³, ANA CAROLINA MAISONNAVE ARISI^{1*}

1 Depto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis-SC

2 Universidade do Contestado, UnC Concórdia.

3 EMBRAPA – Suínos e Aves, Concórdia-SC

*Corresponding Author. Mailing adress: Depto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina. Av. Admar Gonzaga, 1346 CEP 88034-001 Florianópolis-SC, BRAZIL. Tel 55 4837215382, E-mail: arisi@cca.ufsc.br

ABSTRACT

Multiplex PCR was used to investigate the presence of enterotoxins genes (*sea*, *seb*, *sec*, *sed* and *see*) and *femA* gene (specific for *Staphylococcus aureus*) in coagulase-positive *Staphylococci* (CPS) isolated from cheese and meat products. From 102 CPS isolates, 91 were positive for *femA*, 10 for *sea*, 12 for *sed* and four for *see*.

Key words: *Staphylococcus aureus*, enterotoxins, multiplex PCR

OCORRÊNCIA DE *Staphylococcus aureus* E DETECÇÃO POR PCR MULTIPLEX DE GENES DE ENTEROTOXINAS CLÁSSICAS EM QUEIJO E DERIVADOS CÁRNEOS

RESUMO

PCR multiplex foi empregado para investigar a presença de genes de enterotoxinas estafilocócicas (*sea*, *seb*, *sec*, *sed* e *see*) e do gene *femA*, específico para *S.aureus*, em cepas de estafilococos coagulase positiva (ECP) isoladas de queijos e derivados cárneos. De 102 cepas, 91 foram positivas para *femA*, 10 para *sea*, 12 para *sed* e 4 para *see*.

Palavras-chave: *Staphylococcus aureus*; enterotoxinas, PCR multiplex

Staphylococcus aureus is the predominant specie involved in staphylococcal food-poisoning outbreaks, although other coagulase-positive *Staphylococci*, such as *S. intermedius* and *S. hyicus*, may be enterotoxigenic (5, 34, 35). Despite *S. aureus* produce a large variety of enterotoxins (A, B, C, D, E, G, H, I, J, K, L, M, N, O, P, Q, R and U), 95 % of poisoning outbreaks were caused by classical enterotoxins: A, B, C, D and E (24) and enterotoxin A is the most frequently detected (21). Staphylococcal enterotoxins are thermostable and also resistant to gastrointestinal proteases such as pepsin, explaining its ability in remaining active after ingestion (7, 8, 36).

The amount of staphylococcal enterotoxins required for establishment of typical symptoms of food poisoning is very low, ranging from 20 ng to 1 µg (32). Moreover, to produce sufficient enterotoxins to cause illness requires approximately 10^5 *Staphylococci* colony-forming units per gram (19) Several studies evaluated the capability of staphylococcal strains isolated from foods to produce the classical enterotoxins (A, B, C, D and E) (2, 5, 8, 13, 15, 18, 20, 26, 31, 33). In Brazil, several studies reported counts of coagulase-positive *Staphylococci* above the maximum levels allowed by the Brazilian legislation (11) in sausages (colonial sausage), milk and milk products (1, 3, 4, 5, 6, 10, 12, 13, 14, 23, 25).

The aim of the present work was to evaluate contamination by coagulase-positive *Staphylococci* (CPS) in meat and milk-derived products commercialized in Santa Catarina, SC, Brazil and to detect the presence of genes for classical staphylococcal enterotoxins A, B, C, D and E (*sea*, *seb*, *sec*, *sed* and *see*) and for gene *femA*, specific for *S. aureus* species, using multiplex PCR.

A total of 72 food samples including mozzarella (15 samples), American cheese (15 samples), colonial cheese (15 samples), colonial sausage (18 samples) and

salaminho (09 samples) were collected from markets in Alto Uruguai Catarinense region (AMAUC), in Santa Catarina state, Brazil, from 2005 to 2007.

The mozzarella (A, B, C) and American cheese brands analyzed in this work are under Federal Inspection Service (SIF), while colonial cheese brands are from different inspection services: State Inspection (SIE) (G brand), Municipal Inspection (SIM) (H brand) and SIF (I brand). Five (A, B, C, D, E) out of six brands of colonial sausages are inspected by SIE. G brand is inspected by SIM (Concórdia - SC). Salaminho brands (A, B, C) are inspected by SIF.

For *S. aureus* enumeration (17), serial dilutions of food homogenates were plated on Baird Parker agar (Oxoid) with 5% egg yolk tellurite emulsion (Oxoid) and incubated at 35 °C for 48 h. After this period, typical colonies (circular, smooth, convex, gray to jet-black, frequently with light-colored (off-white) margin, surrounded by opaque zone and frequently with an outer clear zone) were counted and five colonies were transferred to MacConkey agar (Oxoid) and blood agar. Colonies that grow in blood agar and not grow in MacConkey were tested for Gram coloration, coagulase, catalase, oxidase, urease and maltose.

Total DNA was extracted from 5 mL of a coagulase-positive staphylococcal culture grown at 35 °C (± 2 °C) for 16-24 h in Brain Heart Infusion (Merck) broth. DNA was isolated using the Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega Corporation, Madison, WI, USA) and lysozyme 10 mg.mL⁻¹ (Sigma Aldrich). Enterotoxigenic *S. aureus* strains ATCC 13565 (*sea*), ATCC 14458 (*seb*), ATCC 19095 (*sec*), ATCC 23235 (*sed*) e ATCC 27664 (*see*) were used as positive controls and *Staphylococcus xylosum* ATCC 29971 as negative control.

Detection of specific genes for *S. aureus* (*femA*) and for enterotoxins A, B, C, D, and E was carried out according to Mehrotra, Gehua, Johnson (27), with some

modifications, yielding the expected amplicons: 102 bp for *sea*, 132 bp for *femA*, 164 bp for *seb*, 209 bp for *see*, 278 bp for *sed*, 451 bp for *sec*.

For multiplex PCR detection of *sec* and *femA* genes, amplification reactions were performed in final volume of 25 μ L containing PCR buffer (20 mM Tris-HCl, pH 8.4, 50 mM KCl), 1.5 mM $MgCl_2$, 0.2 mM of each dNTP, 0.4 μ M of each primer, 1.25 U Taq DNA polymerase and 100-300 ng of template DNA. Reactions were carried out in MinicyclerTM (MJ Research, Inc. Watertown, MA) with the following program: initial denaturation at 94 °C for 5 min followed by 35 cycles of 94 °C for 2 min, 57 °C for 2 min and 72 °C for 60 s with a final extension at 72 °C for 7 min.

For multiplex PCR detection of *sea*, *seb*, *sed*, *see* and *femA* genes, amplification reactions were performed in final volume of 50 μ L containing PCR buffer (20 mM Tris-HCl, pH 8.4, 50 mM KCl), 3 mM $MgCl_2$, 0.2 mM of each dNTP, 400 nM of each primer, 1.25 U Taq DNA polymerase and 100-300 ng of template DNA. Amplification profile was standardized in 94 °C for 5 min followed by 35 cycles of 94 °C for 2 min, 52 °C for 2 min and 72 °C for 3 min with a final extension at 72 °C for 7 min.

PCR products were separated by electrophoresis at 80 V for 70 min in 2% agarose gel and stained with ethidium bromide. Gels were visualized in a UV transilluminator and images were digitalized with a digital camera (CANON Powershot A70).

Presence of coagulase-positive *Staphylococci* (CPS) was detected in 33 out of 72 analyzed samples. In American and colonial cheeses, from 30 samples analyzed, 19 presented contamination by CPS. However, presence of CPS was not detected in the 15 mozzarella samples. 28.8 % of samples contaminated with CPS presented counts with levels above the limit established by RDC n^o 12 of National Sanitary control Agency (11), which establishes the limit of 10^3 CFU.g⁻¹, for indicative sample, in these products.

Counts in samples inspected by municipal, state and federal inspection services differed significantly, being those in SIF inspected samples significantly lower (mean of 1.4×10^3 CFU.g⁻¹) than the samples inspected by the other two services (1.5×10^5 and 1.7×10^5 CFU.g⁻¹, for SIE and SIM, respectively). In 6 samples of colonial cheese, CPS counts were above 10^5 CFU.g⁻¹. According to FDA (19), in foods with such high counts of CPS the presence of staphylococcal enterotoxin is likely. From 18 samples of colonial sausages, in 9 the concentration of CPS was above the limit established by the Brazilian legislation (11), and among 6 of them, the counts were higher than 10^5 CFU.g⁻¹. All salaminho samples were negative for CPS.

From the 200 *Staphylococcus* spp. isolates, 116 were from American and colonial cheeses and 84 from colonial sausage. 102 (51%) strains were characterized as coagulase-positive *Staphylococci* (CPS), being 67 from colonial sausage and 35 from American and colonial cheeses. The remaining 98 isolates (49%) were coagulase-negative *Staphylococci* (Table 1).

CPS isolates were analyzed by multiplex PCR in order to detect *femA*, *sea*, *seb*, *sec*, *sed* and *see* genes (Figure 1). 91 out of 102 isolates were positive for *femA* gene. All *femA* gene negative CPS isolates (11 isolates) have been isolated from colonial sausage. The *sed*, *sea* and *see* genes were detected in 12, 10 and 4 isolates, respectively (Table 1). None of the isolates was positive for genes *seb* or *sec* genes.

The *femA* gene was detected in all 35 CPS isolates from cheeses, confirming the biochemical characterization. From cheese samples, *sed* was detected in ten isolates and *see* was detected in one isolate (Table 1). In *sed* gene positive isolates, amplification of fragments with 600 and 700 bp was also observed (Figure 1A). The presence of these two extra fragments was observed only when the *sed* fragment was also present. Other authors have also reported the presence of unexpected fragments

in some dairy products evaluated by multiplex PCR for the presence of enterotoxin genes (16).

Among the 56 CPS isolates from colonial sausage that were positive for *femA*, seven were also positive for *sea* and one for *sed* (Figure 1B, Table 1). Three isolates amplified the enterotoxin genes *sea* and *see* simultaneously.

Table 1 and Figure 1

Several authors have also reported that enterotoxin genes *sea* and *sed* are the most common in staphylococci isolated from foodstuffs (5, 7, 8, 30, 33). Minas fresh cheese and raw milk was evaluated and the enterotoxins A, B and C were produced by the strains isolated from minas fresh cheese and raw milk (13). Cheese produced in Serra da Canastra, MG, contained *S. aureus* isolates able to produce enterotoxins B and C (9).

Detection of the enterotoxin genes in the CPS isolates coming from a food is not an indication that the toxins are effectively present in this food. Morandi et al (28) evaluated 107 CPS isolates from dairy products, and observed that enterotoxin genes were detected in 67% isolates, but only 52% of the isolates were capable to produce enterotoxins. These authors reported that the results obtained by multiplex PRC and immunoassay tests were in agreement when tested for the presence of enterotoxins A, C and D (16).

Results of the present work confirm that multiplex PCR is a rapid and sensitive method for screening of enterotoxigenic coagulase-positive *Staphylococci*, being highly specific. Results also indicate that better hygiene practices and better inspection are required in the production of the foods included in the study.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by FAPESC (Universal 2006, process FCTP1378/000), UnC and UFSC.

REFERENCES

1. Adesiyun, A.A.; Webb, L.A.; Romain, H.T. (1998). Prevalence and characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bulk and composite milk and cattle handlers. *J. Food Prot.* 61:629–632.
2. Adwan, G.; Abu-Shanab, B. Adwan, K. (2005). Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in raw milk in the North of Palestine. *J. Biology*, 29:229-232.
3. Almeida Filho, E.S.; Nader Filho, A. (2000). Ocorrência de *Staphylococcus aureus* em queijo tipo “frescal”. *Rev. Saúde Pública*, 34:578-80.
4. Anunciação, L.L.C.; Linardi, W.R.; Carmo, L.S.; Bergdoll, M.S. (1994). Production of staphylococcal enterotoxin A in white cheese. *Braz. J. Microbiol.* 25:68-71.
5. Aragon-Alegro, L. C.; Konta, E. M.; Suzuki, K; Silva, M. G.; Fernandes Júnior, A.; Raal, R.; Rall, V. L. M. (2007). Occurrence of coagulase-positive *Staphylococcus* in various food products commercialized in Botucatu, SP, Brazil and detection of toxins from food and isolated strains. *Food Control*, 18:630-634.
6. Araújo, V.S.; Pagliares, V. A.; Queiroz, M. L. P.; Freitas-Almeida, A. C. (2002). Occurrence of *Staphylococcus* and enteropathogens in soft cheese commercialized in the city of Rio de Janeiro, Brazil. *J. Appl. Microbiol.* 92:1172-1177.
7. Atanassova, V.; Meindl, A.; Ring, C. (2001). Prevalence of *Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxins in raw pork and uncooked smoked ham—a comparison of classical culturing detection and RFLP-PCR. *Int. J. Food Microbiol.* 68:105-113.
8. Balaban, N. ; Rasooly, A. (2000). Review staphylococcal enterotoxins. *Int. J. Food Microbiol.* 61:1-10.
9. Borelli, B. M.; Ferreira, E. G.; Lacerda, I. C. A.; Santos, D. A.; Carmo, L. S.; Dias, R. S.; Silva, M. C. C. (2006). Enterotoxigenic *Staphylococcus* spp. and other microbial contaminants during production of canastra cheese, Brazil. *Braz. J. Microbiol.* 37:545-550.
10. Borges, M. F.; Siqueira, R. S. de; Bittencourt, A. M. ; Vanetti, M. C. D.; Gomide, L. A. M. (1999). Occurrence of *Listeria monocytogenes* in salami. *Rev. Microbiol.* 30:362-64.
11. BRASIL. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2001). Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF.
12. Carmo, L.S. And Bergdoll, M.S. (1990). Staphylococcal food poisoning in Belo Horizonte (Brazil). *Braz. J. Microbiol.* 21:320-323.
13. Carmo, L. S.; Dias, R. S.; Linardi, V. R.; Sena, M. J.; Santos, D. A.; Faria, E.; Pena, E. C.; Jett, M.; Heneine, L.G. (2002). Food poisoning due to

- enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in Minas cheese and raw milk in Brazil. *Food Microbiology*, 19:9–14.
14. Chapaval, L.; Moon, D.H.; Gomes, J.E.; Duarte, F.R.; Tsai, S.M. (2006). Use of pcr to detect classical enterotoxins genes (ent) and toxic shock syndrome toxin-1 gene (tst) in *staphylococcus aureus* isolated from crude milk and determination of toxin productivities of *S. aureus* isolates harboring these genes. *Arq. Inst. Biol. São Paulo*, 73:165-169.
 15. Cunha Neto, A. de ; Silva, C. G. M. da; Stamford, T. L. M. (2002). *Staphylococcus* enterotoxigênicos em alimentos in natura e processados no estado de Pernambuco, Brasil. *Ciênc. Tecnol. Alim.* 22:263-275.
 16. Cremonesi, P.; Luzzana, M.; Brasca, M.; Morandi, S.; Lodi, R.; Vimercati, C.; Agnellini, D.; Caramenti, G.; Moroni, P.; Castiglioni, B. (2005). Development of a multiplex PCR assay for the identification of *Staphylococcus aureus* enterotoxigenic strains isolated from milk and dairy products. *Mol. Cell Probes*, 19: 299–305.
 17. Downes, F. P. ; Ito, K. (eds.) (2001). *Compendium of methods for the microbiological examination of food*. 4.ed. APHA Press, Washington: DC.
 18. Ercolini, D., Blaiotta, G., Fusco, V.; Coppola, S. (2004). PCR-based detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in the early stages of raw milk cheese making. *J. Appl. Microbiol.* 6:1090-1096.
 19. U.S. Food and Drug Administration. 2001. Foodborne pathogenic microorganisms and Natural Toxins. Available at: <http://www.cfsan.fda.gov>. Accessed 12 jul 2007.
 20. Fueyo, J.M.; Martin, M.C.; Gonzalez-Hevia, M.A.; Mendoza, M.C. (2001). Enterotoxin production and DNA fingerprinting in *Staphylococcus aureus* isolated from human and food samples. Relations between genetic types and enterotoxins. *Int. J. Food Microbiol.* 67:139-145.
 21. Hwang, S. Y.; Kim, S. Y.; Jang, E. J.; Kwon, N. H.; Park, Y. K.; Koo, H. C.; Jung, W. K.; Kim, J. M.; Park, Y. H. (2007). Novel multiplex PCR for the detection of the *Staphylococcus aureus* superantigen and its application to raw meat isolates in Korea. *Int. J. Food Microbiol.* 117: 99-105.
 22. Kim, J. S.; Lee, G. G.; Park, J. S.; Jung, Y. H.; Kwak, H. S.; Kim, S. B.; Nam, Y. S.; Kwon, S. T. (2007). A novel multiplex PCR assay for rapid and simultaneous detection of five pathogenic bacteria: Escherichia coli O157:H7, Salmonella, Staphylococcus aureus, Listeria monocytogenes, and Vibrio parahaemolyticus. *J. Food Prot.* 70(7):1656-62.
 23. Lamaita, H.C.; Cerqueira, M.M.O.P.; Carmo, L.S.; Santos, D.A.; Penna, C.F.A.M.; Souza, M.R. (2005). Contagem de *Staphylococcus* spp. e detecção de enterotoxinas estafilocócicas e toxina da síndrome do choque tóxico em amostras de leite cru refrigerado. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 57: 702-709.
 24. Letertre, C.; Perelle, S.; Dilasser, F.; Fach, P. (2003). Identification of a new putative enterotoxin SEU encoded by the egc cluster of *Staphylococcus aureus*. *J. Appl. Microbiol.* 95:38-43.
 25. Loguercio, A.P.; Aleixo, J.A.G. (2001). Microbiologia de queijo Minas Frescal produzido artesanalmente. *Ciência Rural*, 31:1063-1067.
 26. Martín, M. C; González-Hevia, M. A.; Mendoza, M.C. (2003). Usefulness of a two-step PCR procedure for detection and identification of enterotoxigenic staphylococci of bacterial isolates and food samples. *Food Microbiol.* 20:605-610.

27. Mehrotra, M.; Wang, G.; Johnson, W. M. (2000). Multiplex PCR for Detection of Genes for *Staphylococcus aureus* Enterotoxins, Exfoliative Toxins, Toxic Shock Syndrome Toxin 1, and Methicillin Resistance. *J. Clin. Microbiol.* 38:1032-1035.
28. Morandi, S.; Brasca, M.; Lodi, R.; Cremonesi, P.; Castiglioni, B. (2007). Detection of classical enterotoxins and identification of enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* from milk and dairy products. *Vet. Microbiol.* 124:66–72.
29. Morot-Bizot, S. C.; Talon, R.; Leroy, S. (2004). Development of a multiplex PCR for the identification of *Staphylococcus* genus and four staphylococcal species isolated from food. *J. Appl. Microbiol.* 97:1087–1094.
30. Nájera-Sánchez, G.; Maldonado-Rodríguez, R.; Olvera, P. R.; Garza, L. M. de La (2003). Development of two multiplex polymerase chain reaction for the detection of enterotoxigenic strains of *Staphylococcus aureus* isolated from foods. *J. Food Prot.* 66:1055-1062.
31. Nema, V.; Agrawal, R.; Kamboj, D. V.; Goel, A. K.; Singh, L. (2007). Isolation and characterization of heat resistant enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* from a food poisoning outbreak in Indian subcontinent. *Int. J. Food Microbiol.* 117:29-35.
32. Normanno, G.; La Salandra, G.; Dambrosio, A.; Quaglia, N.C.; Corrente, M.; Parisi, A.; Santagada, G.; Firinu, A.; Crisetti, E.; Celano, G. V. (2007). Occurrence, characterization and antimicrobial resistance of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from meat and dairy products. *Int. J. Food Microbiol.* 115:290-296.
33. Portocarrero, S. M.; Newman, M.; Mikel, B. (2002). *Staphylococcus aureus* survival, staphylococcal enterotoxin production and shelf stability of country-cured hams manufactured under different processing procedures. *Meat Sci.* 62:267-273.
34. Silva, W. P. da; Silva, J. A.; Macedo, M. R. P. de; Araújo, M. R. de; Mata, M. M.; Gandra, E. A. (2003). Identification of *Staphylococcus aureus*, *S. intermedius* and *S. hyicus* by PCR amplification of *coa* and *nuc* genes. *Braz. J. Microbiol.* 34:125-127.
35. Silva, W. P. da; Destro, M. T.; Landgraf, M.; Franco, B. D. G. M. (2000). Biochemical characteristics of typical and atypical *Staphylococcus aureus* in mastitic milk and environmental samples of Brazilian dairy farms. *Braz. J. Microbiol.* 31:103-106.
36. Soriano, J. M.; Font, G.; Moltó, J. C; Mañes, J. (2002). Enterotoxigenic staphylococci and their toxins in restaurant foods. *Trends Food Sci. Technol.* 13:60-67.

Table 1. Prevalence of *femA*, *sea*, *seb*, *sec*, *sed* and *see* genes in coagulase-positive *Staphylococci* strains isolated from foods

Type of Food	Number of Isolates	CPS	CPS <i>femA</i> positive	CPS <i>sea</i> positive	CPS <i>seb</i> positive	CPS <i>sec</i> positive	CPS <i>sed</i> positive	CPS <i>see</i> positive
Colonial and American Cheeses	116	35	35	0	0	0	11	1
Colonial Sausage	84	67	56	10	0	0	1	3*
Total	200	102	91	10	0	0	12	4

* These strains were also positive for the presence of *sea* gene.

CPS = Coagulase-positive *Staphylococci*

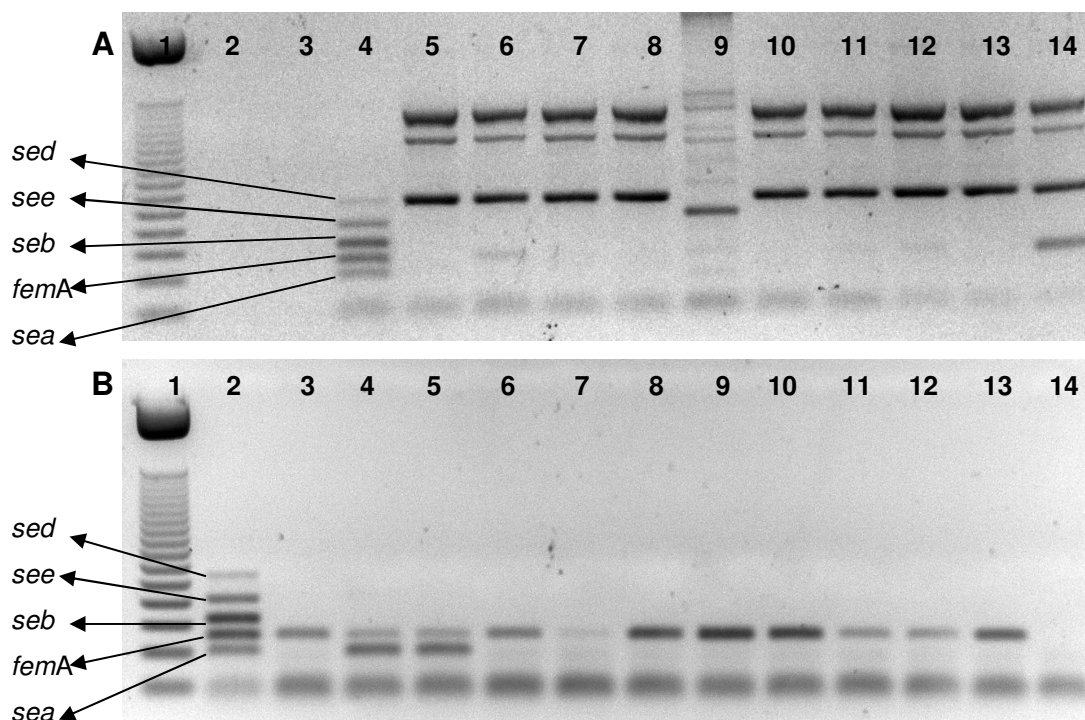


Figure 1. Multiplex PCR of CPS strains isolated from A) cheese, B) colonial sausage.

A) lane 1: Ladder 50bp (Promega); lane 2: water; lane 3: negative control (*Staphylococcus xylosus* ATCC 29971); lane 4: positive control (mix of four ATCC strains – 13565 *sea*, 14458 *seb*, 23235 *sed* and 27664 *see*); lanes 5 – 14: *S. aureus* strains isolated from cheese.

B) Lane 1: Ladder 50 bp (Promega); lane 2: positive control (mix of four ATCC strains – 13565 *sea*, 14458 *seb*, 23235 *sed* and 27664 *see*); lanes 3 – 13: *S. aureus* isolated from colonial sausage; lane 14: negative control (*Staphylococcus xylosus* ATCC 29971).