

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DE ESTAFILOCOCOS COAGULASE NEGATIVA ISOLADOS DE QUEIJOS

CLAUDIO EDUARDO DOS SANTOS CRUXEN¹; **GRACIELE DAIANA FUNCK²**;
JULIANA DE LIMA MARQUES²; **GUILHERME DA SILVA DANNEMBERG²**;
WLADIMIR PADILHA DA SILVA³, **ÂNGELA MARIA FIORENTINI³**

¹UFPel – cbrcruxen@hotmail.com

²UFPel - gracifunck@yahoo.com.br; ju_marques@hotmail.com; gui.dannemberg@gmail.com

³UFPel - wladimir.padilha2011@gmail.com; angefiore@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Estafilococos coagulase negativa (ECN) são micro-organismos Gram-positivos, morfologia de cocos, catalase positiva, anaeróbios facultativos, não formadores de esporos, conhecidos por terem aplicação tecnológica na indústria de alimentos (DE VOS et al., 2009). Esse grupo de bactérias contribui para a formação do *flavor* característico de embutidos cárneos fermentados (BARRIÈRE et al., 2001; SIMONOVÁ et al., 2006). A fermentação espontânea de embutidos cárneos, isto é, pela presença de bactérias autóctones dificulta a padronização do produto, pois há uma diversidade de micro-organismos, assim o perfil enzimático pode ser variável, influenciando diretamente nas características do alimento (HOLZAPFEL, 2002).

O isolamento de ECN da microbiota nativa de produtos artesanais é importante, pois eles já estão adaptados às condições extrínsecas (temperatura e umidade), bem como as condições intrínsecas do alimento (acidez, atividade água, interação entre micro-organismos). Permite selecionar ECN com potencial para aplicação em embutidos cárneos fermentados e utilizá-las como culturas iniciadoras, conferindo ao alimento uniformidade, contribuindo para a formação de um sabor genuíno da região. Além disso, a produção de salame a partir de culturas iniciadoras é totalmente dependente da importação dessas culturas, acarretando na dependência de insumos exógenos (TERRA, 2003; FIORENTINI et al., 2009). Sendo assim, objetivou-se caracterizar fenotipicamente e molecularmente ECN isolados de queijos provenientes da região Sudoeste do Rio Grande do Sul com perspectivas de aplicação futura em embutidos cárneos fermentados.

2. METODOLOGIA

Foram analisados fenotipicamente (20) vinte isolados ECN pelo método Vitek® 2 (BioMerieux, França). Para tanto foi utilizado cartões GP Test Kit VTK 2 (Gram-positivas), contendo 43 testes bioquímicos. Seguiu-se as instruções do fabricante no que se refere à preparação do inóculo, incubação, leitura e interpretação dos resultados.

A identificação molecular dos isolados identificados fenotipicamente como sendo *S. xylosus* foi realizada por *Polymerase Chain Reaction* (PCR), sendo a extração de DNA realizada conforme MATTHEWS et al. (1997).

A confirmação do gênero *Staphylococcus* ocorreu conforme BARON et al., (2004), utilizando os *primers* forward 5' GGACGGGTGAGTAACACGTGG 3' e reverse 5' TCCCGTAGGAGTCTGGACCGT 3' que geram um produto de 252 pb. A solução da reação foi preparada contendo 12,5 µL de GoTaq® Green Master

Mix 2X (Promega Corp.), 2 μ L de *primers* na concentração de 10 pmol para o gene 16S rRNA, 2 μ L de DNA (50ng), e 8,5 μ L de água ultrapura para completar o volume final de 25 μ L. Utilizou-se como controles positivos *S. xylosus* ATCC 29971 e *S. aureus* ATCC 25923. A mistura foi amplificada em termociclador MJ Research PTC 100 a 94°C por 4 min, para a desnaturação inicial do DNA e, posteriormente, amplificada por 32 ciclos, onde cada ciclo consistiu em: 2 min a 95°C (desnaturação), 2 min a 52,7°C (anelamento), 2 min a 72°C (extensão) e, por fim, extensão final por 7 min a 72°C.

Para amplificação do gene específico da espécie *S. xylosus* procedeu-se conforme MOROT-BIZOT, et al. (2003) onde foram utilizados os *primers* XYLF 5' - AACGCGCACACGTGATAAAATTAAATG-3' e XYLR 5' - AACGCGCACACAGCAATTACG - 3' que geram um produto de 539 pb. As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 25 μ L, contendo 2 μ L de DNA a (50ng), 2 μ L dos primer específicos a 10 pmol, 12,5 μ L de GoTaq® Green Master Mix 2X (Promega Corp.) e 8,5 μ L de água ultrapura para completar o volume. Como controle positivo foi utilizado *S. xylosus* ATCC 29971 e como controle negativo *S. aureus* ATCC 25923. A mistura foi amplificada em termociclador nas seguintes condições: 5 min a 94°C para desnaturação do DNA seguido de 40 ciclos de 30 seg. a 94°C (desnaturação), 30 seg. a 57°C (anelamento) e 45 seg. a 72°C (extensão) e uma extensão final de 6 min a 72°C.

Os produtos das PCRs foram submetidos a eletroforese a 80V por 70 min em gel de agarose 1,5% em tampão TBE (solução de Tris, ácido bórico e EDTA) 0,5X, utilizando-se o marcador de peso molecular de 1Kb (Invitrogen®). Os produtos amplificados foram corado com GelRedTM e visualizados sob luz UV em transiluminador (Loccus®, L-Pix Touch).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi possível determinar o gênero e a espécie de 17 dos 20 isolados submetidos às análises bioquímicas pelo método Vitek® 2, sendo identificado a prevalência de *S. saprophyticus* (82%). Identificou-se também *S. xylosus* (12%) e *S. cohnii* ssp *erealyticus* (6%).

RUARO et al. (2013) obtiveram 95 isolados a partir de leite cru e queijo do norte da Itália e verificaram que apenas (2) dois isolados não apresentaram atividade para catalase. Os (93) noventa e três isolados restantes apresentaram características de ECN e foram identificados, por métodos moleculares, 17 espécies diferentes. CHAJECKA-WIERZCHOWSKA et al. (2015) isolaram 58 cepas de ECN a partir de queijos, carnes curadas, salsichas, peixes defumados e identificaram por meio de provas fenotípicas e genotípicas a presença de *Staphylococcus xylosus* ($n = 29$), *Staphylococcus epidermidis* ($n = 16$); *Staphylococcus lentus* ($n = 7$); *Staphylococcus saprophyticus* ($n = 4$); *Staphylococcus hyicus* ($n = 1$) e *Staphylococcus simulans* ($n = 1$).

A espécie prevalente em nosso trabalho se trata de uma bactéria comensal presente na pele e na mucosa urogenital de humanos (ISHIHARA et al., 2001), frequentemente relacionada a casos de infecções urinárias (FERREIRA et al., 2012), o que indica possivelmente contaminação pelo manipulador, seja no preparo ou na comercialização do alimento.

Destaca-se que dois (2) isolados, LQ2 e LQ3, foram identificados fenotípicamente como sendo *S. xylosus*, espécie tecnologicamente importante na produção de embutidos cárneos. Verificou-se que ambos não utilizam os carboidratos galactose, maltose, ribose, rafinose, sorbitol, trialose, mas utilizam manitol, manose, sacarose. Diferem entre si quanto à utilização dos carboidratos

xylose e lactose, sendo que o isolado LQ2 utiliza xylose e o isolado LQ3 utiliza a lactose.

Com a caracterização molecular, ambos os isolados LQ2 e LQ3 foram confirmados para o gênero *Staphylococcus*, como observa-se na Figura 1.

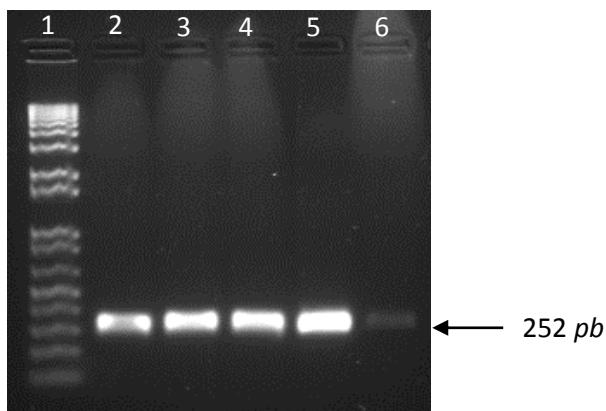


Figura 1. Produtos da amplificação do gene 16 S rRNA (252 pb). Canaletas 2 e 3: *Staphylococcus* spp. isolados de queijos. Canaleta 4: *S. xylosus* ATCC 29971. Canelata 5: *S. aureus* ATCC 19095. Canaleta 6: controle da reação (água). Canaleta 1: marcador de peso molecular 1Kb.

Na confirmação da espécie, os resultados indicaram que apenas o isolado LQ3 se tratava de *S. xylosus*, como se pode observar na Figura 2.

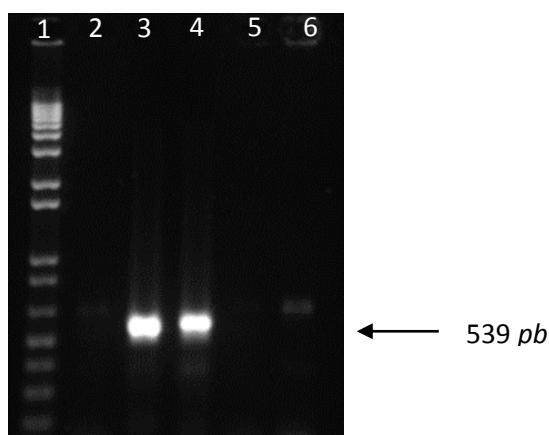


Figura 2. Produtos da amplificação do gene espécie específico para *S. xylosus* (539 pb). Canaletas 2 e 3: *Staphylococcus* spp. isolados de queijos. Canaleta 4: *S. xylosus* ATCC 29971. Canelata 5: *S. aureus* ATCC 19095. Canaleta 6: controle da reação (água). Canaleta 1: marcador de peso molecular 1Kb

Pode-se observar que a caracterização fenotípica é muito importante, pois permite obter informações de relevância acerca das características bioquímicas dos isolados. Não obstante, é necessário avaliar genotipicamente os isolados para confirmar a identificação.

4. CONCLUSÕES

Caracterizou-se fenotipicamente e molecularmente um (1) isolado ECN (LQ3) proveniente de queijos da região Sudoeste do Rio Grande do Sul, como *S. xylosus*. A perspectiva é de utilizar o isolado LQ3 como cultura iniciadora em embutidos cárneos fermentados.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARON, F.; COCHET, M. F.; PELLERIN, J. L.; ZAKOUR, N.B.; LEBON, A.; NAVARRO, A.; PROUDY, I.; LE LOIR, Y.; GAUTIER, M. Development of a PCR Test To Differentiate between *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus intermedius*. **Journal of Food Protection**, 10, 2302-2305, 2004.
- BARRIÈRE, C.; CENTENO, D.; LEBERT, A.; LEROY-SETRIN, S.; BERDAGUÉ, J.L.; TALON, R. Roles of superoxide dismutase and catalase of *Staphylococcus xylosus* in the inhibition of linoleic acid oxidation. **FEMS Microbiology letters**, 201, 181-185, 2001.
- CHAJECKA-WIERZCHOWSKA, W.; ZADERNOWSKA, A.; NALEPA, B.; SIERPINSKA, M.; ŁANIEWSKA-TROKENHEIM, L. Coagulase-negative staphylococci (CoNS) isolated from ready-to-eat food of animal origin e Phenotypic and genotypic antibiotic resistance. **Food Microbiology**, 46, 222-226, 2015
- DE VOS, P.; GARRITY, G. M.; JONES D., KRIERG N.R.; LUDWING W.; RAINY F.A.; SCHLEIFER K. & WHITMAN W. **Bergey manual of Systematic Bacteriology: The Firmicutes**. New York: Springer. 2º edição, 2009.
- FERREIRA, A. M.; BONESSO, M. F.; MONDELLI, A. L.; CUNHA, M. L. R. S. Identification of *Staphylococcus saprophyticus* isolated from patients with urinary tract infection using a simple set of biochemical tests correlating with 16S-23S interspace region molecular weight patterns. **Journal of Microbiological Methods**, 91, 406-411, 2012.
- FIORENTINI, A. M., SAWITZKI, M. C., BERTOL, T.M.; BROD, F.C.A.; PELISSER, M.R.; ARISI, A.C.M. & SANT'ANA, E.S. Phenotypic and Molecular Characterization of *Staphylococcus xylosus*: Technological Potential for Use in Fermented Sausage. **Brazilian archives of biology and technology**, 52, 737-745, 2009
- HOLZAPFEL, W. H. Appropriate starter culture technologies for small-scale fermentation in developing countries. **International Journal of Food Microbiology**, 75, 197-212, 2002
- ISHIHARA, S.; YOKOI, S.; ITO, M.; KOBAYASHI, S.; DEGUCHI, T. PATHOLOGIC SIGNIFICANCE OF *Staphylococcus saprophyticus* IN COMPLICATED URINARY TRACT INFECTIONS. **Urology**, 53, 17-20, 2001.
- MATTHEWS, K. R., ROBERSON, J., GILLESPIE, B. E., LUTHER, D. A., OLIVER, S. P. Identification and differentiation of coagulase-negative *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction. **Journal of Food Protection** 60, 686-688. 1997.
- 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 Microbiological Methods**, 55, 279-286, 2003.
- RUARO, A.; ANDRIGHETTO, C.; TORRIANI, S.; LOMBARDI, A. Biodiversity and characterization of indigenous coagulase-negative staphylococci isolated from raw milk and cheese of North Italy. **Food Microbiology**, 34, 106-111, 2013.
- SIMONOVÁ, M., STROMPFOVÁ, V., MARCIŇÁKOVÁ, M., LAUKOVÁ, A., VESTERLUND, S., LATORRE-MORATALLA, M. L., BOVER-CID, S. & VIDAL-CAROU, M. C. Chracterization of *Staphylococcus xylosus* and *Staphylococcus carnosus* isolated from Slovak meat products. **Meat Science**, 73, 559-564, 2006.
- TERRA, N. N. **Apontamentos de Tecnologia de Carnes**. São Leopoldo: Editora Unisinos, 2003.