



Cátia Daniela Leite Oliveira

Desenvolvimento de teste molecular para deteção de enterotoxinas de *Staphylococcus aureus* em leite

Dissertação realizada no âmbito do mestrado de Segurança Alimentar, sob orientação da Professora Doutora Gabriela Jorge da Silva e coorientação da mestre Anabela Correia de Almeida, apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro de 2017



UNIVERSIDADE DE COIMBRA



FFUC FACULDADE DE FARMÁCIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Cátia Daniela Leite Oliveira

Desenvolvimento de teste molecular para deteção de enterotoxinas de *Staphylococcus aureus* em leite

Dissertação realizada no âmbito do mestrado de Segurança Alimentar, sob orientação da Professora Doutora Gabriela Jorge da Silva e coorientação da Mestre Anabela Correia de Almeida e apresentado á Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Coimbra, Setembro de 2017

O estudo apresentado nesta dissertação foi realizado no laboratório de diagnóstico veterinário, Vetdiagnos, localizado no Biocant park em Cantanhede.

Agradecimentos

O trabalho apresentado nesta dissertação foi fruto de muito esforço e dedicação, foi uma longa jornada, com altos e baixos. Não posso deixar de agradecer a todos os que fizeram parte desta caminhada e que fizeram com que tudo isto fosse possível.

Em primeiro lugar, quero agradecer aos meus pais, por todo o apoio, todo o carinho e dedicação, pois sem eles nada disto seria possível. São e serão sempre o meu porto de abrigo e nunca em palavras lhes vou poder agradecer o que fizeram por mim durante o meu percurso académico. Obrigada de coração, pai e mãe, por tudo.

Quero ainda agradecer aos meus irmãos, Hugo e Maria, por ouvirem os meus desabafos, pelos conselhos, pelas palavras de consolo e por me darem motivação para continuar na luta pelo sonho.

A vocês, Carolina e Daniela, quero agradecer por terem aparecido na minha vida, por tornarem este percurso académico o melhor que alguma vez poderia ter tido. Obrigadas por terem tornado Coimbra uma cidade com mais encanto e por me fazerem sentir o que é de facto a saudade de que todos os que por cá passaram tanto falam. Obrigada por estarem sempre aqui, disponíveis para me ajudar, para me encorajar a continuar e me fazer sorrir nos piores momentos. E que seja sempre assim...

Não posso deixar de agradecer à Anabela Almeida, por ter tornado tudo isto possível, por me guiar durante esta última etapa, por me mostrar que sou capaz e que com determinação tudo se consegue. Tudo ficou muito mais fácil ao ter para além de uma coorientadora, uma amiga com a qual posso contar. Obrigada por acreditares em mim.

Agradeço à empresa onde trabalho, à Vetdiagnos, por me ter proporcionado a realização deste projeto nas suas instalações e ainda às minhas colegas de trabalho, especialmente à Diana, por me darem sempre uma palavra de incentivo quando precisei.

Quero ainda agradecer à Professora Doutora Gabriela Jorge da Silva, por toda a ajuda que me deu, por se ter mostrado sempre disponível para tudo, por ter mostrado muitas das vezes qual o caminho certo a seguir. Esteve sempre presente durante este percurso e penso que não poderia ter escolhido melhor profissional para me orientar neste tema. Muito obrigada.

Por último, mas não menos importante, quero agradecer-te a ti, Micael, por seres o namorado mais compreensivo do mundo. Não sei como te agradecer toda a paciência que tiveste para me aturar quando estava nos meus piores dias. Obrigada pelas longas conversas de motivação, por me obrigares a continuar e me impedires de desistir tantas das vezes em

que pensei fazê-lo. Obrigada por acreditar nas minhas capacidades e me mostrares que é tudo uma questão de determinação. Nunca te vou conseguir agradecer o que fizeste por mim nestes últimos meses. Posso dizer que se consegui finalizar esta tese de mestrado, devo-o muito a ti.

Obrigada a todos, sem vocês não teria chegado até aqui.

Índice

| | |
|--------------------------|-------------|
| Índice de tabelas | III |
| Lista de figuras | IV |
| Abreviaturas | VI |
| Resumo | VII |
| Abstract | VIII |

Capítulo 1- Introdução

| | |
|--|---|
| I.Introdução | I |
| 1.1 Importância de <i>Staphylococcus aureus</i> | 2 |
| 1.2 Reservatórios de <i>Staphylococcus aureus</i> e meios de transmissão | 3 |
| 1.3 Doenças provocadas por <i>Staphylococcus spp.</i> | 3 |
| 1.4 Intoxicações alimentares causadas por <i>Staphylococcus aureus</i> | 4 |
| 1.5. Enterotoxinas Estafilocócicas | 5 |
| 1.6. <i>Staphylococcus aureus</i> em animais | 6 |
| 1.7. Leite como veículo de transmissão de enterotoxinas estafilocócicas | 6 |
| 1.8. Técnicas de Biologia molecular: PCR simples e PCR multiplex | 7 |

Capítulo 2- Objetivos

| | |
|-------------|----|
| 2.Objetivos | 13 |
|-------------|----|

Capítulo 3- Materiais e Métodos

| | |
|---|----|
| 3. Materiais e Métodos | 15 |
| 3.1. Obtenção das amostras e conservação | 17 |
| 3.2 Isolamento bacteriano | 17 |
| 3.3 Extração de DNA | 18 |
| 3.4. Desenho de primers | 18 |
| 3.5 Otimização dos primers | 19 |
| 3.6 Otimização da reação de PCR multiplex | 21 |

| | |
|---|----|
| Capítulo 4- Resultados e Discussão | |
| 4. Resultados e Discussão | 25 |
| 4.1 Resultados do isolamento bacteriano de <i>S. aureus</i> | 27 |
| 4.2 Montagem e otimização do PCR multiplex | 28 |
| 4.3 Teste do PCR multiplex nas amostras recolhidas | 31 |
| | |
| Capítulo 5- Conclusão | |
| 5. Conclusão | 41 |
| | |
| Referências Bibliográficas | 43 |
| | |
| Anexos | |
| Anexo I | 50 |

Índice de Tabelas

Tabela I. Patologias associadas às diferentes espécies de *Staphylococcus spp.*

Tabela II. Sequência de primers, número de acesso (Genebank), tamanho dos produtos de PCR, temperatura de “melting” e referências utilizadas.

Tabela III. Esquema da preparação da reação de PCR

Tabela IV. Programação no termociclador

Tabela V. Presença e ausência de $MgCl_2$ na reação

Tabela VI. Variação no volume de DNA

Tabela VII. Concentração de primers utilizada nas amostras a testar

Tabela VIII. Resultados do crescimento e isolamento em cultura de *S. aureus*

Tabela IX. Resultados do PCR multiplex obtidos em função da origem do leite e do tipo de amostra.

Lista de Figuras

Figura 1. *Staphylococcus aureus* visualizado ao microscópio eletrónico (adaptado de <https://goo.gl/images/MRYdwc>)

Figura 2. Esquema representativo da técnica PCR (adaptado de <https://goo.gl/images/GyCXtC>)

Figura 3. Resultados obtidos por PCR individual em gel de agarose a 3% corado com “green safe premium”, para cada uma das estirpes ATCC. **(M)** Marcador de massa molecular NzyDNA Ladder V (Nzytech), Genes: **(1)** Enterotoxina A, **(2)** Controlo (-), **(3)** Enterotoxina B, **(4)** controlo (-), **(5)** Enterotoxina C, **(6)** Controlo (-), **(7)** Enterotoxina D, **(8)** Controlo (-), **(9)** Enterotoxina E

Figura 4. Resultados da corrida em gel de agarose a 3%, corado com Green Safe Premium das reações submetidas às condições C e D de variação na concentração de DNA - **(M)** marcador de massa molecular NzyDNA Ladder V (Nzytech). Genes: **(1)** Enterotoxina A; **(2)** Enterotoxina B; **(3)** Enterotoxina C; **(4)** Enterotoxina D; **(5)** Enterotoxina E; **(6)** Controlo negativo.

Figura 5. Resultados da corrida em gel de agarose a 3%, corado com Green Safe Premium, das reações submetidas às condições A e B, de variação na concentração de MgCl₂. **(M)** marcador de massa molecular NzyDNA Ladder V (Nzytech), Genes: **(1)** Enterotoxina A; **(2)** Enterotoxina B; **(3)** Enterotoxina C; **(4)** Enterotoxina D; **(5)** Enterotoxina E; **(6)** Controlo negativo.

Figura 6. Resultados obtidos na corrida em gel de agarose a 3% corado com Green Safe Premium, dos produtos de PCR para testar o multiplex. **(M)** marcador de massa molecular NzyDNA Ladder V (Nzytech)

Figura 7. Resultados obtidos na corrida em gel de agarose a 3% corado com Green Safe Premium, dos produtos de PCR com nova alteração na concentração de primers **(I)**, **(M)** marcador de massa molecular NzyDNA Ladder V (Nzytech)

Figura 8. Separação electroforética em gel de agarose a 3% corado com Green Safe dos produtos de PCR multiplex das amostras de leite. **(M)** marcador de massa molecular NzyDNA Ladder V (Nzytech), Linhas 2-18 amplificação de ES de DNA de colónias **(2)** A8 **(3)** A10, **(4)** A12 **(5)** A13 **(6)** A14 **(7)** A15 **(8)** A16 **(9)** A17 **(10)** A1 **(11)** A2, **(12)** A3 **(13)** A4 **(14)** C(+), **(15)** C(-), **(16)** A5, **(17)** A6, **(18)** A7; Linhas 19-25 amplificação de ES de DNA de leite **(19)** A1 **(20)** A2, **(21)** A3 **(22)** A4 **(23)** A5, **(24)** A6, **(25)** A7 **(26)** C(+) **(27)** C(-)

Figura 9. Separação electroforética em gel de agarose a 3% corado com Green Safe dos produtos de PCR multiplex das amostras de leite. **(M)** marcador de massa molecular NzyDNA Ladder V (Nzytech), Linhas 1-8 amplificação de ES de DNA de leite **(1)** A8 **(2)** A10 **(3)** A12 **(4)** A13 **(5)** A14 **(6)** A15 **(7)** A16 **(8)** A17 **(C-)** controlo negativo.

Figura 10. Separação electroforética em gel de agarose a 3% corado com green safe dos produtos de PCR multiplex das amostras de leite. **(M)** marcador de massa molecular NzyDNA Ladder V (Nzytech), **(1)** colónia da amostra A18, **(2)** leite da amostra A18, **(3)** colónia da amostra A19, **(4)** leite da amostra A19, **(5)** colónia da amostra A20, **(6)** leite da amostra A20, **(7)** colónia da amostra A21 **(8)** leite da amostra A21, **(9)** colónia da amostra A22, **(10)** leite da amostra A22, **(11)** colónia da amostra A23, **(12)** leite da amostra A23 ; Linha 13-22 ampliação de ES de DNA de leite: **(13)** A24 **(14)** A25 **(15)** A26 **(16)** A27 **(17)** A28 **(18)** A29 **(19)** A30 **(20)** A31 **(21)** A32, **(22)** A33 **(C+)** Controlo positivo, **(C-)** controlo negativo

Abreviaturas

| | |
|-------------------|--|
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| RNA | Ácido ribonucleico |
| MgCl ₂ | Cloreto de magnésio |
| Pb | Pares de base |
| PCR | “Polymerase Chain Reaction” - Reação em cadeia da Polimerase |
| SEA | Enterotoxina estafilocócica tipo A |
| SEB | Enterotoxina estafilocócica tipo B |
| SEC | Enterotoxina estafilocócica tipo C |
| SED | Enterotoxina estafilocócica tipo D |
| SEE | Enterotoxina estafilocócica tipo E |
| FW | “Forward” |
| RV | “Reverse” |
| DNTPs | Desoxirribonucleotídeos Fosfatados |

Resumo

Staphylococcus aureus é uma das inúmeras bactérias que estão presentes no leite. É considerada uma das espécies mais patogénicas do género *Staphylococcus*, pois algumas das suas estirpes estão associadas a surtos de intoxicações alimentares. Estas estirpes produzem enterotoxinas, sendo algumas delas termoestáveis. Por forma a prevenir a contaminação do ser humano com as mesmas, o principal objetivo deste trabalho foi desenvolver um método de biologia molecular, mais especificamente um PCR multiplex, de modo a fazer simultaneamente a deteção dos genes das enterotoxinas estafilocócicas em amostras de leite cru e leite pasteurizado. Este é um método fácil, rápido, sensível e viável.

As toxinas estafilocócicas são transmitidas maioritariamente por gado leiteiro, em animais infetados com mastites. As amostras (n=33) foram recolhidas de diferentes espécies de animais, grandes e pequenos ruminantes, incluindo caprinos (n=11), bovinos (n=7) e ovinos (n=5) e ainda foram recolhidas amostras de leite pasteurizado (n=10). Apenas 20 amostras de leite (60,6%), tiveram crescimento bacteriano para *S. aureus*: os bovinos tiveram 6, os caprinos 9 e os ovinos 5. Destas 20 estirpes apenas 4 (20%) apresentaram expressão do gene da enterotoxina SEC.

O leite é um alimento muito presente na dieta da população portuguesa e cada vez mais devemos estar atentos a quaisquer possíveis contaminantes com impacto negativo na saúde pública, considerando que este trabalho poderá ser um contributo em prol da Saúde Pública. Ao diagnosticar animais infetados com mastite, como estes têm que ser tratados, é também preservada a saúde animal.

Palavras-chave: PCR multiplex; *Staphylococcus aureus*; enterotoxinas estafilocócicas; leite cru; leite pasteurizado

Abstract

Staphylococcus aureus is one of the countless bacteria present in milk. It's considered one of the most pathogenic species of the genus *Staphylococcus*, because some of the strains of this microorganism are often associated with food poisoning. These strains produce enterotoxins, and some of them are resistant to high temperatures. To help to prevent the human contamination with that toxins, the main objective of this study was the development of a molecular test, specifically, a multiplex PCR, to detect the staphylococcal enterotoxins genes in raw milk and pasteurized milk samples. This method is easy, sensitive, fast, and viable.

Staphylococcal enterotoxins are mostly transmitted for dairy cattle, through animals infected with mastitis. The samples (n=33) were collected from different species, including goats (n=11), cows (n=7), and sheep (n=5) and also pasteurized milk (n=10). Only 20 samples showed bacterial growth for *S. aureus*: bovines had 6, goats 9 and sheep 5 positives. Only four of these 20 strains (20%) presented the expression of the SEC gene.

Milk is a very important food in the diet of the Portuguese population, and we must pay attention to any possible contaminants with a negative impact on public health, considering that this work could be a contribution in favor of Public Health. When diagnosed with mastitis, these animals have to be treated and consequently the animal health is also preserved.

Key-words: multiplex PCR; *Staphylococcus aureus*; Staphylococcal enterotoxins; raw milk; pasteurized milk

Capítulo I

Introdução

1. Introdução

1.1. Importância de *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus diferencia-se das outras espécies do género *Staphylococcus* por ser considerada a mais patogénica. Algumas estirpes estão frequentemente associadas a intoxicações alimentares.

É uma representante bastante importante dos cocos gram-positivos. Muitas das vezes forma agrupamentos que se assemelham a um cacho de uva (figura 1).

Apesar de ser ubíqua, *S. aureus* não apresenta mobilidade nem capacidade para formar esporos (Santos et al., 2007) e é uma bactéria anaeróbia facultativa (Barroso, Helena; Meliço-Silvestre, António; Taveira, 2014).

S. aureus pode crescer numa gama de temperaturas que varia de 7 a 45°C, sendo a temperatura ótima de 30 a 37°C, com um pH de 4.2 a 9.3 sendo ótimo de 7 a 7.5 e ainda numa concentração de cloreto de sódio até 15% (Kadariya, Smith e Thapaliya, 2014).

Uma das principais características deste microrganismo é o facto de que algumas das suas estirpes produzem enterotoxinas estafilocócicas, responsáveis por intoxicações alimentares.

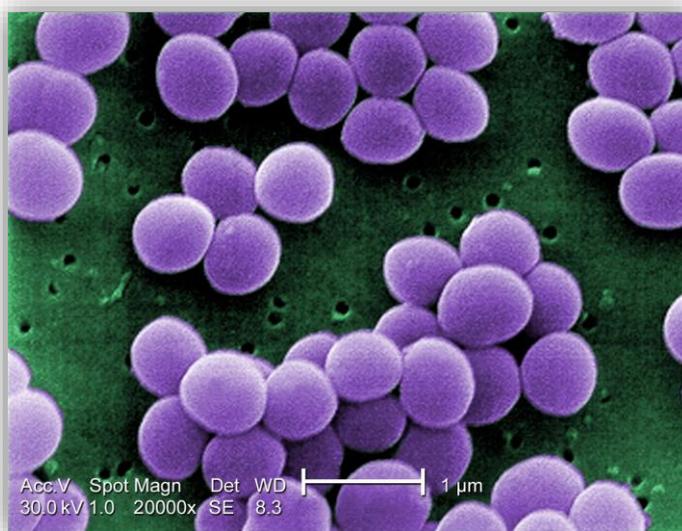


Figura 1 - *Staphylococcus aureus* visualizado ao microscópio eletrónico (adaptado de <https://goo.gl/images/MRYdwc>)

1.2. Reservatórios de *Staphylococcus aureus* e meios de transmissão

Existe uma vasta gama de reservatórios onde *S. aureus* pode ser encontrada, nomeadamente no organismo humano, no ambiente e ainda em animais.

Estima-se que *S. aureus* está presente em cerca de 40% dos indivíduos saudáveis, maioritariamente na pele e nas mucosas da nasofaringe (Ribeiro e Castanheira, 2003). Estes indivíduos portadores são o principal meio de transmissão da bactéria.

Para que ocorra a contaminação alimentar, basta que haja contato direto do portador do microrganismo com alimentos. Os manipuladores de alimentos, durante preparação e o processamento dos mesmos, são um dos principais meios de transmissão de *S. aureus*. Os alimentos em que mais se verifica a ocorrência de *S. aureus* são o fiambre, carne de porco, saladas, gelados e bolos de pastelaria (Barroso, Helena; Meliço-Silvestre, António; Taveira, 2014).

Nos animais produtores de leite, esta bactéria encontra-se nas vias respiratórias, na pele e predominantemente nas glândulas mamárias e, mais uma vez, o manipulador do leite, é o responsável pela sua transmissão.

1.3. Doenças provocadas por *Staphylococcus* spp.

Existem várias patologias associadas a diferentes espécies de *Staphylococcus* spp. (tabela 1).

Para a espécie *S. aureus* especificamente, em humanos, as patologias mais comuns são as intoxicações alimentares, infeções na pele e em tecidos moles, e ainda pneumonias.

Em relação a espécies animais, *S. aureus* causa graves casos de mastites, artrites e infeções no trato urinário (McMillan *et al.*, 2016).

Tabela I-Patologias associadas às diferentes espécies de *Staphylococcus* spp. (adaptado de (Barroso, Helena; Meliço-Silvestre, António; Taveira, 2014).

| Organismo | Patologias associadas |
|-------------------------|---|
| <i>S. aureus</i> | <p>Associado à produção de toxinas: gastroenterites estafilocócicas por intoxicação alimentar: Síndrome do choque tóxico (TSS), síndrome da pele escaldada estafilocócica.</p> <p>Pele e tecidos moles: impetigo (escarlatina estafilocócica, ectima), carbúnculos, foliculite, furúnculos, antraz, celulite, fascite, necrosante, piomiosite</p> <p>Outros: bacteremia, empiema, endocardite, osteomielite, pneumonia e artrite séptica.</p> |
| <i>S. epidermidis</i> | Bacteremia, endocardite, feridas cirúrgicas Infeções urinárias, infeções associadas a cateteres, derivações, material protético e dialisadores peritoneais. |
| <i>S. saprophyticus</i> | Infeções urinárias, infeções oportunistas |
| <i>S. lugdunensis</i> | Artrite, bacteremia, endocardite, osteomielite, peritonite, infeções associadas a cateteres, e infeções da pele e tecidos moles |
| <i>S. haemolyticus</i> | Bacteremia, infeções associadas a cateteres, osteomielite, artrite, endocardite, infeções urinárias, infeções de pele e infeções oportunistas |

1.4. Intoxicação alimentar por *Staphylococcus aureus*

Uma intoxicação alimentar é uma doença de origem alimentar que implica a ingestão de toxinas e não apenas a presença do microrganismo no alimento.

Tal como referido anteriormente, algumas estirpes de *S. aureus* têm capacidade para produzir enterotoxinas.

Estima-se que cerca de 50-70% estirpes de *S. aureus* têm capacidade para produzir, com condições apropriadas, enterotoxinas estafilocócicas termoestáveis (Bogdanovicová *et al.*, 2017).

A intoxicação alimentar causada por *S. aureus* é uma das mais comuns a nível mundial (Bogdanovicová *et al.*, 2017) com uma sintomatologia caracterizada inicialmente por náuseas e, posteriormente vômitos, cólicas abdominais, e em alguns casos diarreias (Seyoum *et al.*, 2016). Estes sintomas iniciam-se entre 1 a 8 horas após a ingestão das toxinas, duram de 24 a 48 horas e a recuperação total ocorre entre 1 a 3 dias. É difícil obter estimativas precisas da incidência das intoxicações de *S. aureus* porque a maior parte dos casos não são reportados (Pinto, Chenoll e Aznar, 2005).

O facto de a intoxicação ser autolimitante, faz com que a maior parte dos indivíduos afetados não recorra a cuidados médicos. Caso haja necessidade de o fazer, o tratamento será apenas no sentido de atenuar os sintomas causados, pois como não se trata da presença do microrganismo mas sim das suas toxinas, não é necessária a utilização de um antibiótico.

1.5. Enterotoxinas Estafilocócicas

S. aureus é um agente patogénico extracelular, pelo que a sua patogenicidade está essencialmente associada à capacidade de produção de fatores extracelulares, como as toxinas (Barroso, Helena; Meliço-Silvestre, António; Taveira, 2014).

Atualmente, existem cerca de vinte tipos de enterotoxinas já descritas (SEs), sendo os cinco grupos serológicos principais, e com significância para doenças de origem alimentar os SEA, SEB, SEC, SED, SEE, tendo já sido identificadas em surtos relacionados com o consumo de leite cru (McMillan *et al.*, 2016). Para os grupos SEC e SEG, existem também alguns subtipos já descritos. Sabe-se que cerca de 95% dos surtos de intoxicações alimentares estafilocócicas são causados por SEs do tipo SEA a SEE, as enterotoxinas

denominadas clássicas. Os restantes 5% poderão estar associados a outras novas SEs identificadas (Cremonesi *et al.*, 2005).

As enterotoxinas são estáveis termicamente e são resistentes à hidrólise pelas enzimas do sistema digestivo.

É de extrema importância ter em consideração que nem todas as estirpes de *S.aureus* produzem enterotoxinas e em quantidade suficiente para a ocorrência de uma intoxicação alimentar (Morandi *et al.*, 2007).

1.6. *Staphylococcus aureus* em animais

No que diz respeito a espécies animais, mais especificamente a grandes e pequenos ruminantes, também estes são frequentemente afetados com a presença de *S.aureus*, sendo esta uma das bactérias responsáveis pela ocorrência de mastites, isto é, o gado leiteiro fica com uma infeção nas glândulas mamárias (McMillan *et al.*, 2016). Como consequência, há perdas consideráveis na economia, pois a infeção faz com que a produção e a qualidade do leite diminuam consideravelmente (Bogdanovicová *et al.*, 2017). Mas, mais problemático do que a questão económica, é o facto de que o leite proveniente de animais infetados constitui um veículo de transmissão da bactéria para o leite, que posteriormente, será ingerido pelo ser humano, especialmente crianças.

1.7. Leite como veículo de transmissão de enterotoxinas estafilocócicas

O leite é um ótimo substrato para o crescimento de *S. aureus*, e hoje em dia sabe-se que este e os seus derivados são uma das principais fontes das intoxicações alimentares estafilocócicas (Morandi *et al.*, 2007). O crescimento deste microrganismo em alimentos como o leite cru constitui um perigo para a saúde pública devido ao risco de intoxicação alimentar (Peles *et al.*, 2007).

Animais de produção de leite que possuem mastites causadas por *S. aureus* contaminam o leite cru. Caso sejam produzidas enterotoxinas durante o crescimento da bactéria, esta passa a ser patogénica e ocorrem consequências nefastas para a saúde pública se o leite for ingerido.

Sendo o leite um alimento bastante utilizado na dieta da população portuguesa atualmente, considerado um alimento de elevado valor nutritivo, deverá ser submetido a rastreios frequentemente, para garantir a segurança da saúde pública.

Foi demonstrado que as SE são altamente resistentes ao tratamento térmico. Um bom exemplo e que obteve resultados que comprovam este facto é a SEA, que retém a sua atividade biológica mesmo depois de submetida a temperaturas de 121°C durante 28 minutos (Seyoum et al., 2016).

Pelos motivos descritos anteriormente, neste estudo foi tido em consideração para além do leite cru, o leite pasteurizado, uma vez que as enterotoxinas resistem a altas temperaturas, ainda que a bactéria que as produz seja completamente eliminada durante a pasteurização.

Por forma a exercer algum controlo e prevenção, já foram criadas algumas técnicas de biologia molecular, baseadas na reação da polimerase em cadeia (PCR) (Polymerase Chain Reaction).

1.8. Técnicas de Biologia Molecular: PCR simples e PCR multiplex

O desenvolvimento de métodos baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR), PCR simples e multiplex, podem ser usados como uma ferramenta de diagnóstico rápida e sensível para detetar a presença de enterotoxinas de *S. aureus*, proporcionando uma opção promissora para uma identificação rápida das toxinas presentes no alimento (Elsayed, El-Bagoury e Dawoud, 2015).

Este método de identificação molecular, baseia-se na amplificação da sequência alvo, neste caso sequências específicas dos genes das enterotoxinas estafilocócicas, sendo um método sensível, rápido e específico.

O objetivo final da PCR é amplificar as regiões de interesse para visualizar a sua presença. Para que este processo possa ocorrer, tem que passar por fases de desnaturação, hibridação e extensão (figura 2). Na mistura de reação, para além do ácido nucleico-alvo (DNA bacteriano), têm que estar presentes os “primers” (“Forward” e “Reverse”), a Taq polimerase e respetivo tampão, os dNTPs e cloreto de magnésio (Barroso, Helena; Meliço-Silvestre, António; Taveira, 2014).

Numa primeira fase, ocorre a desnaturação, ou seja, as cadeias duplas de DNA passam a simples, posteriormente ocorre a hibridação ou “annealing”, que é quando os “primers”, que são sequências iniciadoras de reação da polimerase, se ligam às regiões que irão ser amplificadas em extremidades opostas e cadeias diferentes. Esta temperatura de “annealing” (hibridação) é muito importante, é variável e específica para cada par de primers. Um simples erro na temperatura de hibridação poderá comprometer toda a reação porque os primers não se ligam à cadeia alvo. Finalmente ocorre a extensão, ou seja, a polimerização da cadeia nucleotídica, com o auxílio da Taq Polimerase que é uma enzima que atua acima dos 90°C (Figura 2).

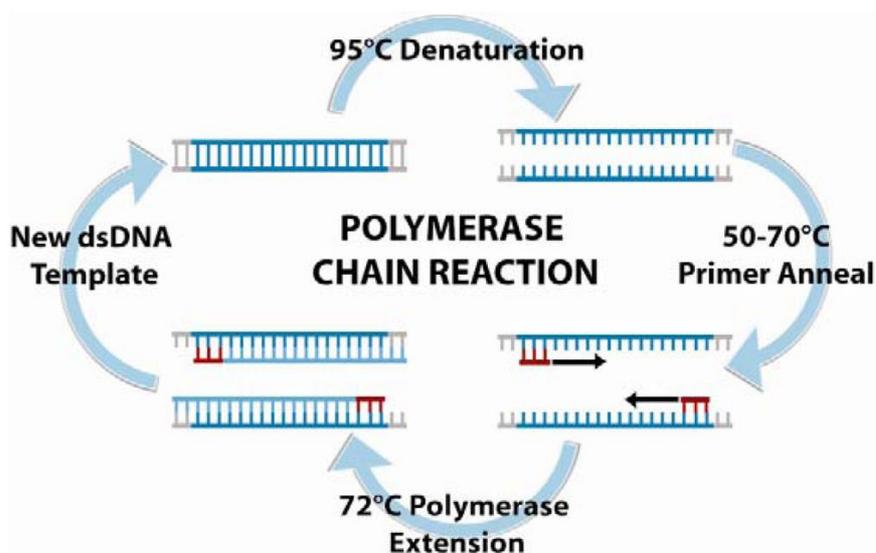


Figura 2- Esquema representativo da técnica PCR (adaptado de <https://goo.gl/images/GyCXtC>)

A PCR multiplex difere da PCR simples pelo facto de ter mais do que um par de primers, cada um com um alvo diferente. Esta técnica permite a deteção em simultâneo de várias sequências genómicas alvo, como é o caso das cinco enterotoxinas clássicas de *S. aureus*.

Ambas as técnicas acima descritas têm vantagens, nomeadamente o facto de que são altamente sensíveis e permitem detetar diretamente o agente patogénico, ou suas toxinas na amostra. Contudo, estas também possuem desvantagens. A principal desvantagem que se pode verificar é a incapacidade de determinar a quantidade necessária para que ocorra intoxicação nos principais grupos de risco (idosos, crianças, doentes), pois estes são mais suscetíveis e o organismo reage de maneira diferente.

A PCR apenas pode demonstrar a presença de genes das enterotoxinas em isolados de *S. aureus* (Peles et al., 2007) e nem sempre a presença de um gene enterotoxigénico implica a produção da respetiva enterotoxina (Bogdanovicová et al., 2017). No entanto, poderemos testar se está a ser expressa através de RNA.

Capítulo 2

Objetivos

2. Objetivos

Embora existam alguns artigos que mostram desenvolvimento de teste PCR multiplex para detetar algumas toxinas de *S. aureus*, este não existe comercialmente no nosso país, não é utilizado em rotinas de laboratórios e não está testado para as espécies produtoras de leite em Portugal.

O principal objetivo deste projeto foi montar um método de biologia molecular para a deteção das toxinas clássicas de *S. aureus* em leite, especificamente um PCR multiplex, que se caracteriza pela sua rapidez, sensibilidade, baixo custo e capacidade de detetar simultaneamente os genes das cinco toxinas num só ensaio, e que possa ser usado na rotina laboratorial em laboratórios de diagnóstico veterinário.

O estudo foi feito em leite cru de ovino, caprino, bovino e ainda em leite pasteurizado.

Além do principal objetivo deste trabalho, foram ainda estabelecidos objetivos específicos:

- Avaliar a frequência da ocorrência de cada uma das SE em cada uma das espécies de ruminantes.
- Avaliar a viabilidade para consumo do leite pasteurizado comercializado atualmente
- Verificar se este método resulta efetivamente melhor quando analisado diretamente das amostras de leite cru ou em colónias de *S. aureus* isoladas do produto.

É esperado que os resultados obtidos neste trabalho possam contribuir para:

- Prevenir intoxicações alimentares provocadas por toxinas de *S. aureus*, pois ao serem diagnosticados com *S. aureus*, os animais têm que ser tratados.
- Permitir compreender a origem e propagação das estirpes nas explorações de leite e adequar o tratamento, nomeadamente com vacinas das estirpes produtoras de SE já isoladas na exploração.

Capítulo 3

Materiais e Métodos

3. Materiais e métodos

3.1. Obtenção das amostras e conservação

Foram recolhidas 23 amostras de leite cru (n=23) de três espécies de animais de produção de leite: leite de bovino (n=7), caprino (n=11) e ovino (n=5). Foi ainda recolhido leite pasteurizado de supermercado (n=10), perfazendo um total de 33 amostras (n=33).

A recolha foi efetuada em explorações de animais diagnosticados com mastite. A maior parte das amostras de leite foi recolhida diretamente do animal e algumas de leite de tanque.

Todas as amostras de leite foram recolhidas para frascos coletores estéreis e foram transportadas até ao laboratório com refrigeração.

Ao chegarem ao laboratório foram colocadas a 4°C até se proceder ao isolamento bacteriano, que foi sempre realizado no dia da recolha.

3.2. Isolamento Bacteriano

Para o isolamento e identificação de *S. aureus* foi utilizado um meio de cultura cromogénico da gama chromID® (Biomérieux), de leitura fácil, com intensidade de cor e especificidade. Caracteriza-se ainda pela elevada sensibilidade, o que contribui para resultados fiáveis. O meio de cultura possui substratos cromogénicos específicos, peptonas e uma base rica em nutrientes. Ao entrar em contacto com o substrato, as bactérias hidrolisam e dão origem a uma coloração específica, neste caso as colónias de *S. aureus* apresentam coloração verde. Esta coloração deve-se à produção de α -glucosidase. O espalhamento do leite foi efetuado com o auxílio de uma ansa, com um volume de 10 μ l e a incubação foi realizada em aerobiose a 37°C, entre 24-48h.

3.3. Extração de DNA

a) Extração de DNA a partir de colônias isoladas:

Uma colônia isolada de *S. aureus* foi colocada com 25 µl de água estéril (Enzymatic/ Fisher Bioreagents) num tubo do tipo Eppendorf e posteriormente colocou-se a 96°C para ocorrer a lise celular e o material genético ficar disponível.

Não existe necessidade de realizar centrifugação porque não foram detetadas diferenças significativas ao nível da pureza nem da especificidade.

b) Extração de DNA diretamente da amostra de leite:

Foi realizada a extração de DNA a partir de 200 µL de leite com o kit NZY Tissue gDNA Isolation Kit (Nzytech), seguindo as instruções do fabricante.

3.4. Desenho de primers

Foram procuradas sequências de primers em artigos científicos com desenvolvimento da técnica PCR multiplex e que continham sequências para cada uma das toxinas em estudo (SEA-SEE) (Rall *et al.*, 2008).

As cadeias nucleotídicas dos genes destas toxinas foram confirmadas no Genbank/ Nucleotide, através do número de acesso e corrigidas no programa Blast para garantir homologia, eliminar as que não tinham interesse e assim selecionar as mais indicadas.

Com o auxílio do programa Primer Express, as sequências foram modificadas de forma a obter amplicões com tamanhos diferentes, para que as bandas de cada gene conseguissem ser visualizadas e distinguidas corretamente.

O resultado final do desenho dos primers, a sequência escolhida, tamanho dos produtos de PCR, temperatura de “melting”, número de acesso na base de dados Genbank, e as referências bibliográficas utilizadas estão descritos na tabela 2.

Tabela II- Sequência de primers, número de acesso (Genebank), tamanho dos produtos de PCR, temperatura de melting e referências utilizadas.

| Primer s | Sequencia nucleotídica | Número de acesso | Amplificação (pb) | TM | Referência |
|-------------|---|---------------------|----------------------|------|------------------------|
| SEA | Fw: CAAGCAAGACGTTATTTACAGGAAA | GQ859135 | 121pb | 58°C | (Rall et al., 2008) |
| | Rv: AATCGTAATTAACCGAAGGTTCTGTAG | | | 58°C | |
| SEB | Fw: TTATGATAATGTTTCGAGTCGAATTTAAA | KC428707.1 | 323 pb | 58°C | |
| | Rv: AATAGTGACGAGTTAGGTAATCTAATTCTTGA | | | 59°C | |
| SEC | Fw: CTAAAAAATTATGACAAAGTGAAAACAGAGT | GQ461752.1 | 225pb | 58°C | |
| | Rv: AAGTACATTTTGTAAAGTCCCATTATCAAA | | | 59°C | |
| SED | Fw: CTGAATTAAGTAGTACCGCGCTAAATAA | KX168622.1 | 575pb | 59°C | |
| | Rv: TTCGGGAAAATCACCCCTTAACA | | | 59°C | |
| SEE | Fw: TTAAAGGTTTTTTCACAGGTCATCC | M21319.1 | 430pb | 59°C | |
| | Rv: TCATAACTTACCGTGGACCCTTC | | | 58°C | |

3.5. Otimização dos primers

Após a hidratação dos primers foi realizada uma mistura dos mesmos, “Forward” (Fw) com “Reverse” (Rv) para cada um dos genes das enterotoxinas. A solução de trabalho da mistura de primers foi efetuada para uma concentração de 250 µM e para um volume final de 100 µL. Foram utilizados 2,5 µL de cada primer, Fw e Rv, e foi adicionada água estéril (Enzymatic/ Fisher bioreagents) até perfazer os 100 µL, para cada um dos genes das enterotoxinas (SEA-SEE).

Para auxiliar na otimização deste teste molecular foram utilizadas estirpes comerciais produtoras das toxinas que queríamos detetar. São estirpes de referência de uma coleção, de uma empresa alemã denominada DSMZ. A referência da estirpe A é 18597, da B é 18586, da C 18587, da D 18588 e por fim, a da E é 18589. Estas amostras foram utilizadas como controlo positivo, a estirpe A produz SEA, a B produz SEB, C produz SEC, D SED e finalmente, E produz SEE.

Foi realizado um PCR individual para cada uma das estirpes de referência antes de se montar o multiplex, para testar a eficácia dos primers desenhados. Para o PCR foram utilizados

NZYTaq 2x Green Master Mix (NZY tech), água destilada estéril (Enzymatic/ Fisher bioreagents) e a mistura de primers previamente efetuada (tabela III).

Tabela III- Esquema da preparação da reação de PCR

| REAGENTES | QUANTIDADES |
|---|-----------------|
| 2x Green Master Mix | 5 µL por reação |
| H ₂ O | 2 µL por reação |
| Primers (Fw:250 nM, Rv:250 nM) | 1 µL por reação |
| D(Rall <i>et al.</i> , 2008)NA da amostra | 2 µL por reação |
| Volume final = 10 µL por reação | |

Esta mistura de reagentes foi colocada num termociclador (Life Technologies, SimpliAmp Thermal Cycler - A2481 I) segundo a programação da tabela IV.

O produto de amplificação obtido por PCR foi analisado em gel de agarose a 3% corado com GreenSafe Premium (NZY tech) e visualizado sob luz UV num transiluminador (Fisher Scientific, TCP-20.MC). O marcador de massa molecular utilizado foi NzyDNA Ladder V (Nzytech). Os resultados obtidos encontram-se na figura 3.

Tabela IV- Programação no termociclador

| Passo | Temperatura | Tempo | Ciclos |
|-----------------------|-------------|-------------|--------|
| Desnaturação | 95°C | 10 minutos | 1 |
| Desnaturação | 95°C | 1 minuto | |
| Annealing | 59°C | 45 segundos | 40 |
| Extensão | 72°C | 45 segundos | |
| Extensão final | 72°C | 10 minutos | 1 |

3.6. Otimização da reação de PCR multiplex

Após a confirmação de que os primers resultavam corretamente, foi testado o PCR multiplex. As variáveis testadas para a otimização do método foram a concentração de $MgCl_2$, a concentração de DNA e a concentração de primers.

Em primeiro lugar foram testadas as concentrações de $MgCl_2$ e de DNA em paralelo (tabelas V e VI).

Tabela V- Quantidade de $MgCl_2$ na reação

| A-Maior quantidade de $MgCl_2$ (2,25nM) | B- Menor quantidade de $MgCl_2$ (1,25nM) |
|---|--|
| H ₂ O- 1,8 μ L | H ₂ O- 2 μ L |
| Primers- 1 μ L | Primers- 1 μ L |
| 2x Green Master Mix- 5 μ L ($MgCl_2$ a 2,5 mM) | 2x Green Master Mix- 5 μ L ($MgCl_2$ a 2,5 mM) |
| $MgCl_2$ -0,2 μ L | |
| Vf = 8 μ L mix + 2 μ L de DNA | Vf = 8 μ L mix + 2 μ L de DNA |

Tabela VI- Variação no volume de DNA

| C- Maior quantidade de $MgCl_2$ (2,25nM) | D- Menor quantidade de $MgCl_2$ (1,25nM) |
|--|--|
| H ₂ O- 2,8 μ L | H ₂ O- 3 μ L |
| Primers- 1 μ L | Primers- 1 μ L |
| 2x Green Master Mix- 5 μ L ($MgCl_2$ a 2,5 mM) | 2x Green Master Mix- 5 μ L ($MgCl_2$ a 2,5 mM) |
| $MgCl_2$ -0,2 μ L | |
| Vf = 9 μ L mix + 1 μ L de DNA | Vf = 9 μ L mix + 1 μ L de DNA |

Os resultados obtidos são mostrados no capítulo dos Resultados nas figuras 4 e 5.

Posteriormente, e após concluir quais as melhores condições para a técnica relativamente a concentrações de $MgCl_2$ e de DNA, avaliou-se qual a melhor concentração de primers. Para tal, foi testada a mistura com todos pares de primers (125 nM) de cada um dos genes das enterotoxinas (SEA-SEE), os DNAs controlo de cada uma delas, tudo na mesma reação, para se verificar se todas as bandas amplificavam corretamente e se não havia formação de bandas inespecíficas. Os produtos de reação de PCR foram corridos em gel de agarose a 3% e visualizados num transiluminador.

Todas as bandas amplificaram, ainda que as bandas correspondentes aos genes das enterotoxinas SEB, SED e SEE estivessem menos perceptíveis do que as restantes. A SEA por outro lado, apresentava uma banda bastante forte. Por este motivo, foi necessário fazer um ajuste nas concentrações utilizadas de cada primer.

A nova reação consistiu numa mistura que continha uma alteração na concentração dos primers: SEA passou de 125nM para 100 nM, a SEB, SED e SEE passaram de 125 nM a 150 nM, e a SEC manteve-se a 125 nM, para um volume final de 50 μ L. Seguidamente foram corridas as estirpes de referência com esta nova mistura de concentração dos primers para verificar se as bandas amplificavam de igual modo, para posteriormente efetuar o teste para todas as amostras recolhidas de leite. Os resultados obtidos estão representados no capítulo dos Resultados na figura 6.

Procedeu-se ainda a uma segunda alteração na concentração de primers para melhorar a visibilidade das bandas. Nesta segunda alteração, na nova mistura de primers apenas as concentrações de SEB e SEE foram alteradas, passando estas a 200 nM cada uma. Os resultados obtidos encontram-se no capítulo dos Resultados na figura 7.

Uma vez encontrada a concentração correta da mistura de primers (tabela VII), procedeu-se ao teste nas amostras de leite.

Tabela VII- Concentração de primers utilizada nas amostras a testar

| Mistura de primers para a reação de PCR (Volume final de 100 μ L) | |
|---|----------------------|
| Genes das Toxinas | Concentrações |
| SEA | 200nM Fw , 200 nM Rv |
| SEB | 400 nM Fw, 400nM Rv |
| SEC | 300 nM Fw, 300nM Rv |
| SED | 300 nM Fw, 300nM Rv |
| SEE | 400 nM Fw, 400nM Rv |

Capítulo 4

Resultados e Discussão

4.1. Resultados do isolamento bacteriano de *S. aureus*

Tal como referido anteriormente, este teste foi efetuado não só em DNA extraído diretamente do leite, mas também em DNA extraído de colónias isoladas em cultura de *S. aureus* (Ver anexos I), para que se pudesse fazer uma análise em paralelo, com o objetivo de comparar os resultados obtidos e determinar qual o método que teria melhor eficácia.

Num total de 33 amostras (n=33), foram obtidos 20 resultados positivos para o crescimento de *S.aureus*, ou seja 60,6%. Tal como se pode verificar através da análise da tabela VIII, a maioria das amostras de leite cru foram positivas e todos os leites pasteurizados foram negativos.

Os resultados foram os esperados, tendo em conta que algumas das amostras foram recolhidas de leite de tanque, o que diminui a probabilidade do aparecimento da bactéria, pois em leite de tanque existe leite proveniente de vários animais da exploração, e alguns deles não apresentam sintomatologia de mastite, sendo pouco provável que se encontrem infetados com *S. aureus*.

Tabela VIII-Resultados do crescimento e isolamento em cultura de *S. aureus*

| Bovinos | Caprinos | Ovinos | Pasteurizado |
|----------------|-----------------|---------------|---------------------|
| A1: NEG | A8: POS | A19: POS | A24: NEG |
| A2: POS | A9: NEG | A20: POS | A25: NEG |
| A3: POS | A10: POS | A21: POS | A26: NEG |
| A4: POS | A11: NEG | A22: POS | A27: NEG |
| A5: POS | A12: POS | A23: POS | A28: NEG |
| A6: POS | A13: POS | | A29: NEG |
| A7: POS | A14: POS | | A30: NEG |
| | A15: POS | | A31: NEG |
| | A16: POS | | A32: NEG |
| | A17: POS | | A33: NEG |
| | A18: POS | | |

4.2. Montagem e otimização do PCR multiplex

Os perfis de bandas obtidos em gel foram identificados com sucesso. O DNA das estirpes de referência corresponderam à amplificação das regiões SEA, SEB, SEC, SED, SEE (figura 3). Uma vez que nos resultados obtidos foram bons e não houve aparecimento de bandas inespecíficas, concluiu-se que estes primers poderiam ser utilizados no multiplex.

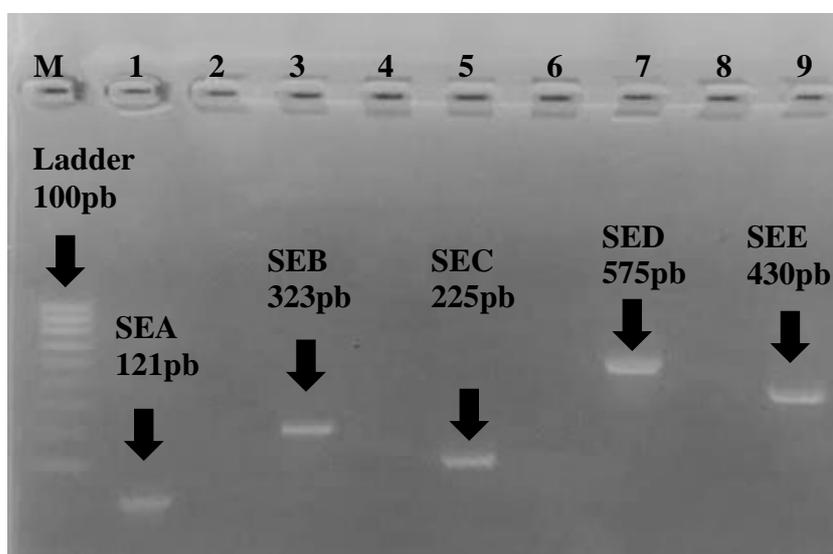


Figura 3-Resultados obtidos por PCR individual em gel de agarose a 3% corado com Green Safe Premium, para cada uma das estirpes de referência. **(M)** Marcador de massa molecular NzyDNA Ladder V (Nzytech), **Genes:** **(1)** Enterotoxina A, **(2)** Controle (-), **(3)**:Enterotoxina B, **(4)** controle (-), **(5)** Enterotoxina C, **(6)** Controle (-), **(7)** Enterotoxina D, **(8)** Controle (-), **(9)** Enterotoxina E

As condições referidas nas tabelas V (variação na concentração de $MgCl_2$, condições A e B) e VI (variação na concentração de DNA, condições C e D) foram testadas para cada uma das amostras (SEA-SEE) e o resultado encontra-se nas Figuras 4 e 5.

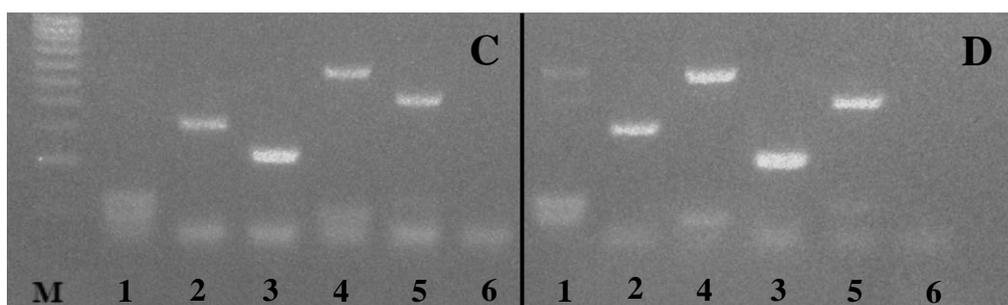


Figura 4- Resultados da corrida em gel de agarose a 3%, corado com Green Safe Premium das reações submetidas às condições C e D de variação na concentração de DNA - **(M)** marcador de massa molecular NzyDNA Ladder V (Nzytech). Genes: **(1)** Enterotoxina A; **(2)** Enterotoxina B; **(3)** Enterotoxina C; **(4)** Enterotoxina D; **(5)** Enterotoxina E; **(6)** Controlo negativo.

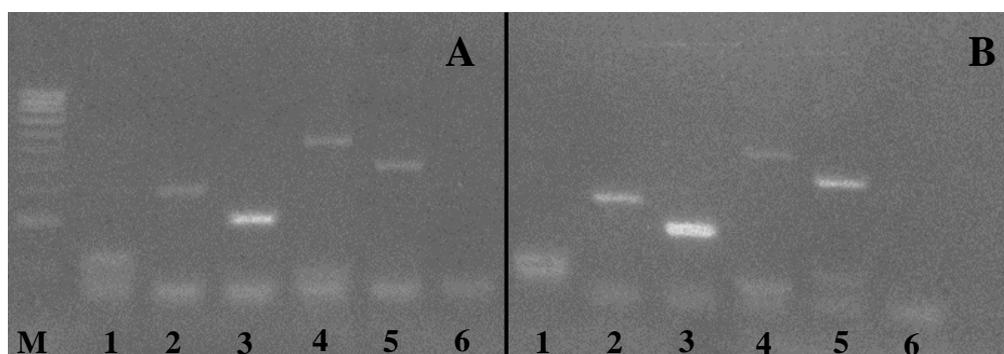


Figura 5- Resultados da corrida em gel de agarose a 3%, corado com Green Safe Premium, das reações submetidas às condições A e B, de variação na concentração de $MgCl_2$. **(M)** marcador de massa molecular NzyDNA Ladder V (Nzytech), Genes: **(1)** Enterotoxina A; **(2)** Enterotoxina B; **(3)** Enterotoxina C; **(4)** Enterotoxina D; **(5)** Enterotoxina E; **(6)** Controlo

Tal como se pode verificar pela análise das figuras 4 e 5, as melhores condições para amplificação das bandas dos genes das enterotoxinas de *S. aureus* são as representadas em C, isto é, presença de uma maior concentração de $MgCl_2$ e apenas 1 μL de DNA, pois em algumas das situações, uma maior quantidade de DNA poderá inibir a reação.

Testou-se, então, a PCR multiplex, cujo resultado é mostrado na figura 6.

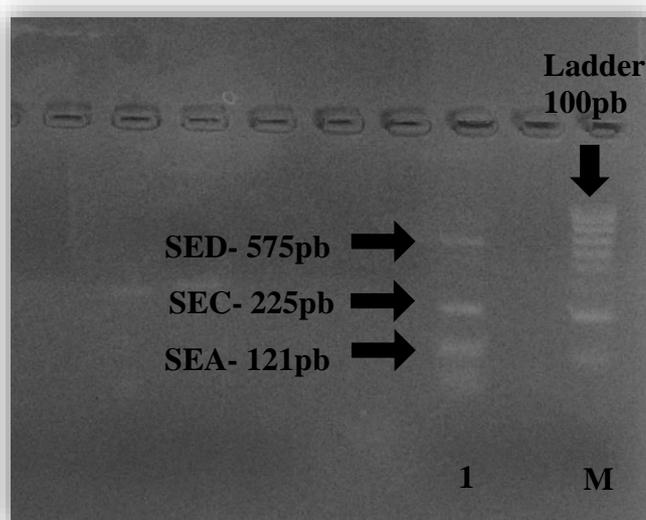


Figura 6-Resultados obtidos na corrida em gel de agarose a 3% corado com Green Safe Premium, dos produtos de PCR para testar o multiplex. **(M)** marcador de massa molecular NzyDNA Ladder V (Nzytech)

Através da análise da figura anterior concluiu-se que as bandas correspondentes aos genes das toxinas SEB e SEE estavam pouco visíveis. Por este motivo, teve que se reajustar a concentração de primers. Os resultados são mostrados na figura 7.

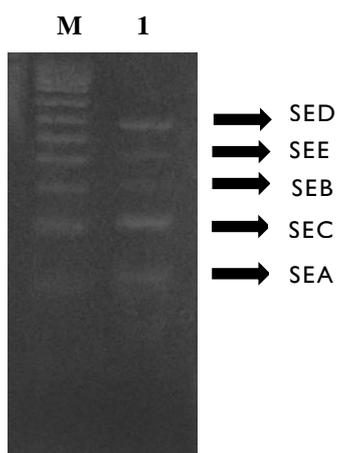


Figura 7-Resultados obtidos na corrida em gel de agarose a 3% corado com Green Safe Premium, dos produtos de PCR com nova alteração na concentração de primers **(1)**, **(M)** marcador de massa molecular NzyDNA Ladder V (Nzytech)

Como podemos verificar na figura 7, as bandas correspondentes aos genes das cinco enterotoxinas amplificaram corretamente, o que significa que a concentração utilizada de cada par de primers foi a adequada. Não houve formação de bandas inespecíficas.

4.3. Teste do PCR multiplex nas amostras recolhidas

Após otimização dos primers e da reação do PCR multiplex, foram testadas as amostras de leite recolhidas. Os resultados obtidos após electroforese são mostrados nas figuras abaixo 8, 9 e 10.

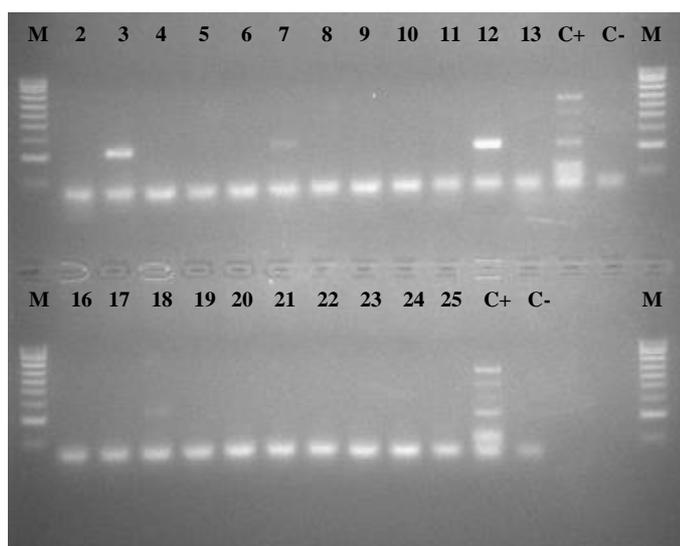


Figura 8- Separação electroforética em gel de agarose a 3% corado com Green Safe dos produtos de PCR multiplex das amostras de leite. **(M)** marcador de massa molecular NzyDNA Ladder V (Nzytech), Linhas 2-18 amplificação de ES de DNA de colónias **(2)** A8 **(3)** A10, **(4)** A12 **(5)** A13 **(6)** A14 **(7)** A15 **(8)** A16 **(9)** A17 **(10)** A1 **(11)** A2, **(12)** A3 **(13)** A4 **(14)** C(+), **(15)** C(-), **(16)** A5, **(17)** A6, **(18)** A7; Linhas 19-25 amplificação de ES de DNA de leite **(19)** A1 **(20)** A2, **(21)** A3 **(22)** A4 **(23)** A5, **(24)** A6, **(25)** A7 **(26)** C(+) **(27)** C(-)

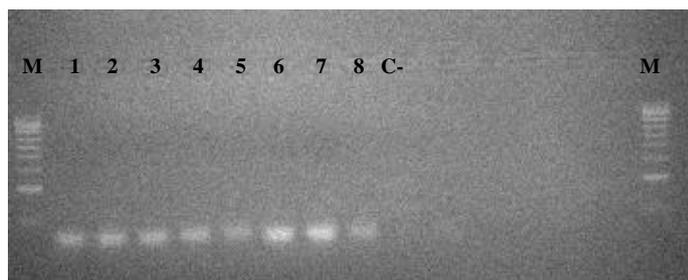


Figura 9- Separação electroforética em gel de agarose a 3% corado com Green Safe dos produtos de PCR multiplex das amostras de leite. **(M)** marcador de massa molecular NzyDNA Ladder V (Nzytech), Linhas 1-8 amplificação de ES de DNA de leite **(1)** A8 **(2)** A10 **(3)** A12 **(4)** A13 **(5)** A14 **(6)** A15 **(7)** A16 **(8)** A17 **(C-)** controlo negativo.

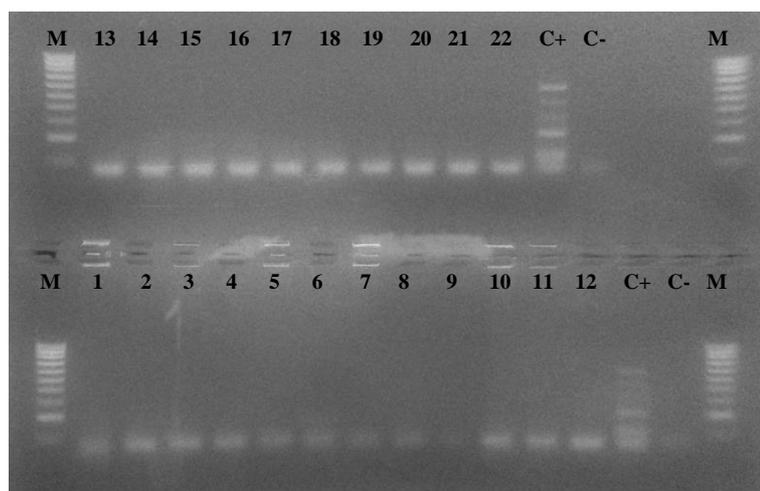


Figura 10- Separação electroforética em gel de agarose a 3% corado com green safe dos produtos de PCR multiplex das amostras de leite. **(M)** marcador de massa molecular NzyDNA Ladder V (Nzytech), **(1)** colónia da amostra A18, **(2)** leite da amostra A18, **(3)** colónia da amostra A19, **(4)** leite da amostra A19, **(5)** colónia da amostra A20, **(6)** leite da amostra A20, **(7)** colónia da amostra A21 **(8)** leite da amostra A21, **(9)** colónia da amostra A22, **(10)** leite da amostra A22, **(11)** colónia da amostra A23, **(12)** leite da amostra A23 ; Linha 13-22 amplificação de ES de DNA de leite: **(13)** A24 **(14)** A25 **(15)** A26 **(16)** A27 **(17)** A28 **(18)** A29 **(19)** A30 **(20)** A31 **(21)** A32, **(22)** A33 **(C+)** Controlo positivo, **(C-)** controlo negativo

A tabela IX mostra os dados após análise dos resultados obtidos no PCR de acordo com o tipo de amostra e da origem do leite.

Tabela IX- Resultados do PCR multiplex obtidos em função da origem do leite e do tipo de amostra.

| Amostra | Origem do leite | DNA (leite ou colônia) | Genes de enterotoxinas |
|----------------|------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| A1 | Bovino | Leite / colônia | NEG / NEG |
| A2 | Bovino | Leite / colônia | NEG / NEG |
| A3 | Bovino | Leite / colônia | NEG / POS: gene SEC |
| A4 | Bovino | Leite / colônia | NEG / NEG |
| A5 | Bovino | Leite / colônia | NEG / NEG |
| A6 | Bovino | Leite / colônia | NEG / NEG |
| A7 | Bovino | Leite / colônia | NEG / POS: gene SEC |
| A8 | Caprino | Leite / colônia | NEG / NEG |
| A9 | Caprino | Leite | NEG / NEG |
| A10 | Caprino | Leite / colônia | NEG / POS: gene SEC |
| A11 | Caprino | Leite | NEG / NEG |
| A12 | Caprino | Leite / colônia | NEG / NEG |
| A13 | Caprino | Leite / colônia | NEG / NEG |
| A14 | Caprino | Leite / colônia | NEG / NEG |
| A15 | Caprino | Leite / colônia | NEG / POS: gene SEC |
| A16 | Caprino | Leite / colônia | NEG / NEG |
| A17 | Caprino | Leite / colônia | NEG / NEG |
| A18 | Caprino | Leite / colônia | NEG / NEG |
| A19 | Ovino | Leite / colônia | NEG / NEG |
| A20 | Ovino | Leite / colônia | NEG / NEG |
| A21 | Ovino | Leite / colônia | NEG / NEG |
| A22 | Ovino | Leite / colônia | NEG / NEG |
| A23 | Ovino | Leite / colônia | NEG / NEG |
| A24 | Leite Pasteurizado | Leite | NEG |
| A25 | Leite Pasteurizado | Leite | NEG |
| A26 | Leite Pasteurizado | Leite | NEG |
| A27 | Leite Pasteurizado | Leite | NEG |
| A28 | Leite Pasteurizado | Leite | NEG |
| A29 | Leite Pasteurizado | Leite | NEG |
| A30 | Leite Pasteurizado | Leite | NEG |
| A31 | Leite Pasteurizado | Leite | NEG |
| A32 | Leite Pasteurizado | Leite | NEG |
| A33 | Leite Pasteurizado | Leite | NEG |

Das três espécies em estudo, apenas em duas delas, caprinos e bovinos, amplificaram genes referentes às enterotoxinas estafilocócicas. Tal como se pode verificar, apenas ocorreu essa amplificação quando se utilizou o DNA das colônias isoladas de *S. aureus* (tabela IX), o que significa que o prévio isolamento da bactéria em cultura é mais eficaz do que a extração de DNA diretamente do leite, com o kit comercial. Ao extrair o DNA diretamente das colônias isoladas da placa, o método para além de maior grau de especificidade, parte de um nível superior de pureza.

A3, A7, A10 e A15, são amostras positivas para o gene SEC, sendo este o único gene existente nas amostras do estudo. Estes resultados obtidos foram concordantes com alguns estudos já realizados em que o gene SEC era dos que aparecia mais frequentemente. Na Hungria (Peles *et al.*, 2007), realizou-se um estudo onde foi testada a presença dos genes das enterotoxinas de *S.aureus* em leite e alguns derivados, com a técnica de PCR. Foi testado leite de bovino, de vacas com mastite e ainda leite de tanque. Utilizaram a técnica de PCR multiplex e verificaram que os genes referentes às enterotoxinas SEA e SEC estavam presentes em quatro isolados dos 59 totais, o SEB em cinco e o SED em dois isolados.

(Pinto, Chenoll e Aznar, 2005) realizaram um estudo em alimentos potencialmente contaminados com *S.aureus*. Um dos objetivos deste estudo foi avaliar a frequência dos genes das toxinas de *S.aureus* neste tipo de alimentos e comparar a eficácia do método de PCR relativamente a outros. Apesar de não se tratar de PCR multiplex, mas sim, de PCR normal, foram detetados alguns dos genes em questão. Quarenta dos 131 isolados (31%) foram positivos: 14 destes (11%), foram positivos para o gene SEA, 22 (17%) para o SEC, 1 (0,8%) para SEB, e para o SEE não houve nenhuma amostra positiva. Apesar das amostras não serem de leite, o gene SEC continua a ser o mais frequente.

Na China, em Shanghai, foi testada a diversidade genética e o potencial dos fatores de virulência de *S.aureus* em alimentos processados e crus. Através da técnica de PCR, os resultados obtidos, para a presença de genes que produzem as enterotoxinas clássicas de *S.aureus*, foram positivos: SEA (5.6%), SEB (3,5%), SEC (9.9%) e SED (2,8%), num total de 142 isolados. O gene correspondente à SEC apareceu maioritariamente em leite cru.

Em São Paulo, no Brasil, também foi realizado um estudo que tinha como principal objetivo detetar os genes das enterotoxinas de *S.aureus* em leite cru de bovino e leite pasteurizado. A bactéria foi encontrada em 38 das 54 amostras de leite cru, em 8 amostras de leite pasteurizado antes de terminar a data de validade e ainda em 11 analisadas após o término da validade. O gene para a enterotoxina A foi o mais frequente, com 41%, seguido pelo SEC com frequência de 20,5%, SEB com 7,7%, SED com 12,8% e finalmente SEE com 5,1% (Rall *et al.*, 2008).

Segundo Morandi *et al.* (2007), o leite e os seus derivados estão frequentemente envolvidos em surtos de intoxicação alimentar. Por este motivo foi realizado um estudo para detetar e identificar os genes das toxinas de *S.aureus*. O microrganismo foi isolado de leite de gado bovino, caprino, ovino, búfalo e de alguns lacticínios.

Os isolados de bovinos apresentavam frequentemente o gene da enterotoxina SEA e SED, enquanto o SEC predominou nas estirpes de caprinos e ovinos. Após a análise dos resultados chegou-se à conclusão que as variações nas estirpes de *S.aureus* tem a ver com a origem de cada uma delas, e por esse motivo são diferentes.

Contudo, existem alguns estudos que contrariam os resultados obtidos nos trabalhos reportados. Temos o exemplo de em estudo realizado no Irão (Seyoum *et al.*, 2016), que tinha como objetivo analisar a frequência de genes das enterotoxinas estafilocócicas através da técnica de PCR em leite cru de bovino. Foram obtidas 52 estirpes de *S.aureus* nas 246 amostras de leite recolhidas. Nos 52 isolados, o gene mais frequente foi o da enterotoxina A (SEA), com 30.7%, seguido da SEB com com 26.9% e a SED com 15,37%. Neste estudo não aparece o gene referente à enterotoxina C (SEC).

No presente trabalho, através da análise dos resultados das amostras em estudo, verificamos que a presença de *S.aureus* ocorre maioritariamente em caprinos. Nos bovinos houve 6 estirpes de *S. aureus* (18,2%), nos caprinos 9 estirpes (27,3%) e nos ovinos 5 estirpes (15,1%). Nestas 20 estirpes de *S. aureus* apenas quatro delas possuíam o gene da enterotoxina C (SEC), ou seja, apenas 20%, duas de leite de bovino e duas de leite de caprino.

É de salientar que neste projeto o número de amostras foi limitado, o que dificulta a comparação da ocorrência e frequência dos genes das enterotoxinas entre cada espécie. O reduzido número de amostras prende-se com o facto de que este projeto foi realizado num laboratório de diagnóstico veterinário e as amostras utilizadas foram exclusivamente as recebidas para diagnóstico laboratorial, não tendo sido feitas amostras teste previamente. e estando limitado às ocorrências em que o Médico Veterinário responsável procedeu ao envio de amostra adequada para diagnóstico laboratorial. Contudo, o laboratório continuará a utilizar as amostras de leite de explorações com animais com diagnóstico de mastite, para ampliar o estudo aqui apresentado, até ter uma amostragem significativa para apresentar um estudo de prevalência de toxinas de *S.aureus* nas explorações de espécies pecuárias produtoras de leite, a nível nacional. Adicionalmente, o aumento do número de amostras permitirá a realização de ensaios para determinação da sensibilidade do teste, podendo determinar concentrações mínimas de DNA de *S. aureus* e número de unidades formadoras de colónias de *S. aureus* para deteção dos genes das toxinas, bem como a especificidade, procedendo á comparação com outros testes. A especificidade do teste será alvo ainda de uma validação

adicional, com a sequenciação dos amplicões obtidos no teste, para cada um dos genes das toxinas de *S. aureus*.

O PCR multiplex funcionou corretamente, verificou-se que o método a ser implementado será com cultura de *S.aureus*, pois apenas deste modo conseguimos visualizar a amplificação dos genes. Um dos motivos pelos quais este método resulta melhor poderá ser porque a extração de DNA é feita diretamente de colónias isoladas, conferindo maior especificidade, e eliminando as impurezas do leite. Um inconveniente para a adoção deste método poderá ser o tempo que a análise demora a ser concluída, isto porque a incubação a 37°C é de 24-48h, ou seja, ainda que o PCR multiplex seja relativamente rápido, sendo a extração, PCR e electroforese, um procedimento de cerca de 4h, este só poderá ser efetuado após a incubação e isolamento das colónias de *S. aureus*. Por outro lado, o passo de incubação apresenta a vantagem de permitir confirmar se existem colónias de *S. aureus* na amostra, evitando que se realize o multiplex PCR de uma amostra, que não apresente *S. aureus*. O passo de cultura da amostra para isolamento das colónias de *S. aureus*, apesar de conferir especificidade ao método não permite distinguir entre estirpes ambientais de *S. aureus* e estirpes patogénicas como as que causam as mastites nos animais dos quais provêm as amostras. Uma das medidas que poderia ser tomada era a definição de um número de colónias a partir da qual se consideraria que a contaminação com *S. aureus* era significativa e prosseguir para o PCR. No entanto, neste trabalho considerou-se que sempre que se observasse na placa de cultura, pelo menos uma colónia de *S. aureus*, esta seria valorizada prosseguindo-se com a extração do seu DNA.

O teste desenvolvido será ainda alvo de ensaios adicionais, para uma validação com vista à certificação do mesmo de forma a poder ser disponibilizado como nova ferramenta de diagnóstico no laboratório.

Em conclusão, neste estudo, tendo em conta o número de amostras utilizadas, podemos afirmar que as estirpes de *S.aureus*, ocorrem mais frequentemente em caprinos, e que no leite prevalece o gene da enterotoxina estafilocócica C. Este facto poderá sugerir que existem mais casos de mastites causadas por *S. aureus* nos caprinos e bovinos do que nos ovinos. Contudo, são dados que devem ser confirmados com um maior número de amostras.

A diversidade genética e a sua frequência poderão estar relacionadas com a distribuição geográfica, isto é, as estirpes portuguesas podem ser diferentes no que diz respeito ao tipo de genes presentes em cada uma das espécies.

O leite pasteurizado analisado não apresentou crescimento de *S.aureus*, o que significa que as amostras recolhidas estavam viáveis para consumo e não apresentavam qualquer risco para a saúde pública. Contudo, há que salientar que é uma situação que poderá ocorrer devido à estabilidade térmica das enterotoxinas. Assim, é imperativo que se minimize as condições de crescimento em leite contaminado com *S. aureus*, de forma a evitar uma maior produção de enterotoxina, se for o caso.

O resultado obtido do PCR multiplex será considerado um indicador, uma vez que este apenas deteta os genes responsáveis pela produção da enterotoxina estafilocócica e não a proteína em si, isto é, a presença do gene, não implica a presença da toxina, pois esta poderá não ter sido produzida. Para saber se a proteína está presente, teriam de ser realizados testes complementares. Contudo, à semelhança de outros testes de diagnóstico que existem, é considerado um teste de elevado valor preditivo de um risco para a saúde pública e, atualmente, os testes de Biologia Molecular já são disponibilizados e realizados, para diagnóstico nos laboratórios de Segurança Alimentar.

Este método será uma mais-valia quando implementado em laboratório, pois poderá facilmente diagnosticar infeções por *S.aureus*, permitir que os animais sejam devidamente tratados e desta forma prevenir as intoxicações alimentares ao consumidor.

Capítulo 5

Conclusão

5. Conclusão

As intoxicações alimentares causadas por *S. aureus* são uma realidade que não podemos ignorar, pois ocorrem regularmente. Por este motivo é necessário haver um controlo frequente dos potenciais veículos de transmissão deste agente patogénico. Uma das formas é controlar os animais produtores de leite, pois ao diagnosticá-los com mastite, estes terão obrigatoriamente que ser tratados.

Apesar de o número de amostras não ser significativo neste estudo, esta técnica será futuramente utilizada em laboratório como teste de diagnóstico, em animais de diferentes explorações e irá permitir avaliar qual a frequência dos genes das enterotoxinas estafilocócicas nas estirpes portuguesas. Contudo, neste estudo verificou-se que os casos de mastite por *S. aureus* poderão estar mais associados a bovinos e caprinos. Apenas o gene da SEC foi detetado em 20% das amostras, que sugere um risco não muito elevado, mas que não é de negligenciar. Num total de 33 amostras (n=33), houve 20 estirpes de *S. aureus* (60,6%), sendo que 6 eram de bovinos e 9 de caprinos e 5 de ovino. No que diz respeito à expressão de genes, apenas o gene da SEC foi detetado em 4 das 20 amostras (20%).

Deve ser tido em conta que neste teste molecular apenas estamos a detetar o gene da toxina e não a expressão a proteína, mas é um bom indicador de risco.

O desenvolvimento deste teste de multiplex deve ser encarado do ponto de vista empresarial, de aplicação Nacional, pois foi desenvolvida uma nova ferramenta de diagnóstico que se poderá disponibilizar no mercado do leite e que vem complementar o diagnóstico que já é feito atualmente e que se limita apenas à deteção de *S. aureus*. Deste modo, será promovida a saúde animal e preservada a segurança alimentar.

Capítulo 6

Referências Bibliográficas

BARROSO, Helena; MELIÇO-SILVESTRE, António; TAVEIRA, Nuno – **Microbiologia médica I**. 2014. LIDEL-Edições Técnicas, Lda. ISBN 978-989-752-057-0

BOGDANOVICOVÁ, Katerina *et al.* - Milk powder risk assessment with staphylococcus aureus toxigenic strains. **Food Control**. ISSN 09567135. 73:2017) 2–7. doi: 10.1016/j.foodcont.2016.07.007.

CREMONESI, Paola *et al.* - Development of a multiplex PCR assay for the identification of Staphylococcus aureus enterotoxigenic strains isolated from milk and dairy products. **Molecular and Cellular Probes**. ISSN 08908508. 19:5 (2005) 299–305. doi: 10.1016/j.mcp.2005.03.002.

COTAR, Ani Ioana *et al.* - Screening of molecular virulence markers in Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa strains isolated from clinical infections. **International Journal of Molecular Sciences**. ISSN 14220067. 11:12 (2010) 5273–5291. doi: 10.3390/ijms11125273.

ELSAYED, Mohamed Sabry; EL-BAGOURY, Abd Elrahman Mahmoud; DAWOUD, Mai Abdallah - Phenotypic and genotypic detection of virulence factors of Staphylococcus aureus isolated from clinical and subclinical mastitis in cattle and water buffaloes from different farms of Sadat City in Egypt. **Veterinary World**. ISSN 22310916. 8:9 (2015) 1051–1058. doi: 10.14202/vetworld.2015.1051-1058

HENNEKINNE, Jacques Antoine; BUYSER, Marie Laure DE; DRAGACCI, Sylviane - Staphylococcus aureus and its food poisoning toxins: Characterization and outbreak investigation. **FEMS Microbiology Reviews**. ISSN 01686445. 36:4 (2012) 815–836. doi: 10.1111/j.1574-6976.2011.00311.x.

HWANG, Sun Young *et al.* - 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**. ISSN 01681605. 117:1 (2007) 99–105. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.02.013.

KADARIYA, Jhalka; SMITH, Tara C.; THAPALIYA, Dipendra - Staphylococcus aureus and Staphylococcal Food-Borne Disease: An Ongoing Challenge in Public Health. **BioMed Research International**. ISSN 23146141. 2014:2014) 1–9. doi: 10.1155/2014/827965.

MCMILLAN, Kate *et al.* - Characterization of Staphylococcus aureus isolates from raw milk sources in Victoria, Australia. **BMC microbiology**. ISSN 1471-2180. 16:1 (2016) 169. doi: 10.1186/s12866-016-0789-1.

MERZ, Axel; STEPHAN, Roger; JOHLER, Sophia - Staphylococcus aureus isolates from goat and sheep milk seem to be closely related and differ from isolates detected from bovine milk. **Frontiers in Microbiology**. ISSN 1664302X. 7:MAR (2016) 1–7. doi: 10.3389/fmicb.2016.00319.

MORANDI, S. *et al.* - Detection of classical enterotoxins and identification of enterotoxin genes in Staphylococcus aureus from milk and dairy products. **Veterinary Microbiology**. ISSN 03781135. 124:1–2 (2007) 66–72. doi: 10.1016/j.vetmic.2007.03.014.

PELES, F. *et al.* - Characterization of Staphylococcus aureus strains isolated from bovine milk in Hungary. **International Journal of Food Microbiology**. ISSN 01681605. 118:2 (2007) 186–193. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.010.

PEREIRA, V. *et al.* - Characterization for enterotoxin production, virulence factors, and antibiotic susceptibility of Staphylococcus aureus isolates from various foods in Portugal. **Food Microbiology**. ISSN 07400020. 26:3 (2009) 278–282. doi: 10.1016/j.fm.2008.12.008.

PINTO, Beatriz; CHENOLL, Empar; AZNAR, Rosa - Identification and typing of food-borne Staphylococcus aureus by PCR-based techniques. **Systematic and Applied Microbiology**. ISSN 07232020. 28:4 (2005) 340–352. doi: 10.1016/j.syapm.2005.01.002.

RALL, V. L. M. *et al.* - PCR detection of staphylococcal enterotoxin genes in Staphylococcus aureus strains isolated from raw and pasteurized milk. **Veterinary Microbiology**. ISSN 03781135. 132:3–4 (2008) 408–413. doi: 10.1016/j.vetmic.2008.05.011.

RIBEIRO, I.; CASTANHEIRA, R. - Treatment and prevention of *Staphylococcus aureus* infection and colonization [Tratamento e prevenção das infecções e da colonização por *Staphylococcus aureus*]. **Revista Portuguesa de Pneumologia**. ISSN 08732159. 9:5 (2003) 395–409.

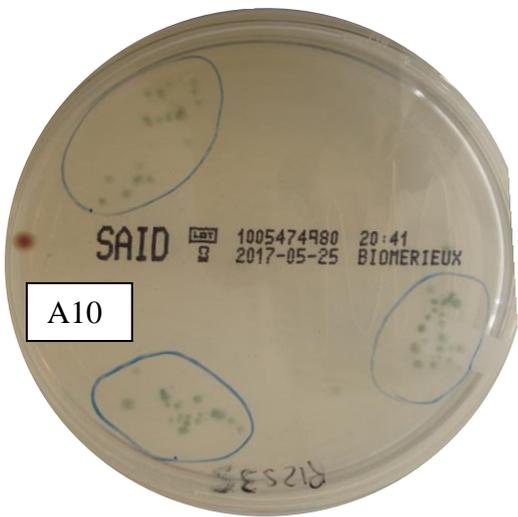
SANTOS, André Luis Dos *et al.* - *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. ISSN 1676-2444. 43:6 (2007) 413–423. doi: 10.1590/S1676-24442007000600005.

SEYOUM, Eyasu Tigabu *et al.* - Enterotoxin gene profile of *staphylococcus aureus* isolates recovered from bovine milk produced in central Ethiopia. **Journal of Infection in Developing Countries**. ISSN 19722680. 10:2 (2016) 138–142. doi: 10.3855/jidc.6797.

THAKER, H. C.; BRAHMBHATT, M. N.; NAYAK, J. B. - Isolation and identification of *staphylococcus aureus* from milk and milk products and their drug resistance patterns in anand, gujarat. **Veterinary World**. ISSN 09728988. 6:1 (2013) 10–13. doi: 10.5455/vetworld.2013.10-13.

Anexos

A3, A7, A10, A15- Exemplos de crescimento bacteriano positivo



A31, A32, A33- Exemplos de crescimento bacteriano negativo

