

IDENTIFICAÇÃO GENOTÍPICA DIRETA DE BACTÉRIAS POTENCIALMENTE PATOGÊNICAS EM QUEIJOS E EMBUTIDOS

*Luciana Furlaneto Maia
Natara Fávaro Tosoni
Janaína Schueler
Fernanda Carla Henrique
Rodolfo Campos Zanin
Márcia Cristina Furlaneto*

1 INTRODUÇÃO

A produção de queijo tipo Minas Frescal e embutidos é uma das principais fontes de renda de pequenos produtores e também uma forma de identidade de muitos estados brasileiros (FURTADO, 1980). No entanto, essa atividade ainda é realizada por produtores que não se atêm às boas práticas de higiene e fabricação e são, portanto, potenciais veículos de contaminações por diversos micro-organismos patogênicos.

Na cidade de Londrina-PR, é comum o comércio de queijo tipo Minas Frescal e embutidos de fabricação artesanal, principalmente, em feiras livres da cidade. As bactérias comumente encontradas nesses produtos são os *Enterococcus* e as bactérias do grupo dos coliformes, como a *Escherichia coli* e a *Salmonella*, micro-organismos diretamente relacionados à manipulação inadequada dos produtores e à falta de higiene durante a produção do alimento.

O desenvolvimento da amplificação de DNA *in vitro* pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) facilitou a identificação de micro-organismos em alimentos. Para esse fim, diversos trabalhos relatam o uso de PCR para a identificação de *Enterococcus* sp. (*E. faecium* e *E. faecalis*), *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* (ETEC e EPEC). Dessa forma, este estudo visa isolar e identificar tais micro-organismos de queijo Minas Frescal e embutidos utilizando a técnica de PCR, a partir do DNA de amostras identificadas pelos testes bioquímicos e diretamente do alimento.

2 BACTERIAS POTENCIALMENTE PATOGÊNICAS CONTAMINANTES DE ALIMENTOS

Os alimentos de origem animal ou vegetal, frescos ou processados, incluindo a água, podem veicular diversos micro-organismos patogênicos, causadores de diversas perturbações fisiológicas nas pessoas que os consomem. Os alimentos que, eventualmente, estejam contaminados por micro-organismos causadores de doenças, ao ser ingeridos, permitem que os patógenos ou os seus metabólitos invadam os tecidos do hospedeiro causando graves doenças.

2.1 COLIFORMES TOTAIS E TERMOTOLERANTES

O grupo dos coliformes totais incluem bactérias da família *Enterobacteriaceae*, que fermentam a lactose, com formação de gás a 37 °C por 48h, Bacilos Gram-negativos, anaeróbios facultativos, não esporogênicos, capazes de fermentar a lactose com produção de gás, em 24 horas de incubação a 35 ± 0,2 °C, para todos os alimentos (LANDGRAF, 2005). O grupo dos coliformes termotolerantes incluem bactérias que fermentam a lactose com produção de gás à temperatura de 44-45 °C. Fazem parte desse grupo os seguintes gêneros: *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Klebsiella*. Desses quatro gêneros, apenas a *Escherichia* tem como *habitat* primário o trato intestinal do homem ou animal. Os demais gêneros podem ser encontrados, além das fezes, em vegetais e solo. A presença de coliformes totais não indica necessariamente contaminação fecal e nem a presença de coliformes termotolerantes. A pesquisa de presença desse grupo indica, com maior segurança, as condições higiênico-sanitárias do produto (LANDGRAF, 2005). Sua ocorrência em alimentos é avaliada sob dois aspectos: (1) por ser uma enterobactéria, sua presença no alimento indica contaminação de origem fecal, portanto, ele foi produzido em condições higiênicas insatisfatórias; (2) o outro aspecto a ser considerado é que algumas cepas são patogênicas para

o homem e animais e causam, principalmente, diarreias (KAPPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

2.1.1 ESCHERICHIA COLI

Escherichia coli é uma bactéria de morfologia em bastonete Gram-negativo, anaeróbia facultativa e oxidase negativa (JAY, 1994). É considerada um micro-organismo patogênico classificado como “de severo perigo para a população em geral, representando risco de morte, sequelas crônicas ou longa duração” no grupo de risco IA pela *International Commission on Microbiological Specifications for Foods* (ICMSF, 2002)

A presença de *E. coli* em alimentos pode ser interpretada de duas formas. Por se tratar de uma enterobactéria, sua presença nos alimentos indica, necessariamente, contaminação de origem fecal, ou seja, condições higiênico-sanitárias inadequadas. Outro ponto é que muitas classes de *E. coli* são patogênicas para o homem e animais (FRANCO, 2004).

Com base nos fatores de virulência, distintos sorotipos O:H, mecanismos de patogenicidade (interação com a mucosa intestinal), manifestações clínicas e epidemiologia as cepas patogênicas de *E. coli* são divididas em seis grupos: (1) *E. coli* enteropatogênica (EPEC), (2) *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), (3) *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), (4) *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), (5) *E. coli* enteroagregativa (EAggEC) e (6) *E. coli* difusamente adesiva (*diffusely adherent E. coli*) (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

Escherichia coli Enteropatogênica Clássica (EPEC) é um sorotipo de *E. coli* há muito conhecido que causa gastroenterites em crianças. A contaminação por esse micro-organismo se caracteriza pelos seguintes sintomas: diarreia acompanhada de dores abdominais, vômitos e febre, com a doença durando cerca de seis a três dias. A patogenicidade dessa cepa se deve à capacidade de adesão e destruição das microvilosidades das células intestinais. A EPEC está entre os principais agentes enteropatogênicos, em especial na diarreia do lactente, com altos índices de mortalidade. Esse micro-organismo é responsável por cerca de 30% de diarreia aguda em crianças pobres com idade inferior a seis meses. Recém-nascidos e lactentes jovens são as vítimas mais frequentes de infecção por *E. coli* enteropatogênica clássica. A diarreia causada pela infecção por *E. coli* é muito mais severa do que aquelas causadas por outros micro-organismos patogênicos. É acompanhada de dores abdominais, vômitos e febre. A doença dura em torno de seis horas até três dias, com incubação de 17 a 72 horas (FRANCO, 2004).

Escherichia coli Enterotoxigênica (ETEC) são cepas de *E. coli* que produzem enterotoxinas nocivas para os seres humanos. Os sintomas da doença causada por ETEC, quando muito grave, se parecem com os da cólera: fezes aquosas e desidratação, e tratando-se de pessoas com quadro de desnutrição, a desidratação ocorre de maneira muito severa. As bactérias desse grupo são as causas principais de diarreia em países subdesenvolvidos, pelo fato de estes não oferecerem condições de saneamento básico ou por ser inadequado. ETEC é considerada uma das principais causas da chamada “diarreia do viajante” que acomete pessoas que se deslocam com frequência para esses países subdesenvolvidos. Surtos de contaminação por *E. coli* enterotoxigênica em países da Europa e EUA estão ligados ao consumo de água e/ou alimentos contaminados por esse micro-organismo (FRANCO, 2004).

Segundo a Resolução – RDC Nº 12, de 2 de janeiro de 2001, o limite máximo para contagem de coliformes termotolerantes para queijos de alta umidade é de 5×10^3 UFC/grama de alimento e, para embutidos frescos, o valor máximo é de 5×10^3 UFC/grama de alimento (BRASIL, 2001).

2.1.2 SALMONELLA SPP.

Salmonella pertence à família *Enterobacteriaceae* e compreende bacilos Gram-negativos não esporulados, anaeróbios facultativos e são capazes de utilizar o citrato como única fonte de carbono. Esse gênero de bactéria é amplamente distribuído na natureza, sendo que o trato intestinal de humanos e animais são os mais comuns. Salmoneloses relacionada à laticínios é, na maioria das vezes, causada por leite cru ou inadequadamente pasteurizado e também queijo (FRANCO, 2004).

Algumas infecções de salmoneloses, como as espécies Typhi e Parathypi, provocam septicemia, febre, e infecções em praticamente todos os órgãos. Os sintomas aparecem após 12 a 36 horas de contato com o micro-organismo com duração de um a quatro dias. Outros sintomas podem aparecer depois de algumas semanas da infecção, artrite e síndrome de Reiter. Outras espécies de *Salmonella* causam cólicas abdominais, febre, dores de cabeça, diarreia e náusea (SILVA, 2007a). Em crianças e recém-nascidos, a infecção por *Salmonella* pode apresentar sintomas gravíssimos já que essa bactéria entra na corrente sanguínea e pode lesionar diversos órgãos. Há relatos de meningite e problemas renais decorrentes da infecção por *Salmonella* (FRANCO, 2004).

Acreditava-se que para uma infecção por *Salmonella* era necessária uma ingestão de um número de células superior a 10^8 . Entretanto, alguns fatores podem

alterar esse valor: dependendo do sorotipo de *Salmonella* e, da eficiência dos mecanismos de defesa no indivíduo e das características do alimento, ou seja, alimentos com alto teor lipídico, as *Salmonellas* ficam protegidas nos glóbulos de gordura e não são afetadas por enzimas e nem pela acidez gástrica. Essa bactéria é o agente de doença mais comum de origem alimentar que causa surtos de diarreia e nos EUA anualmente são diagnosticados aproximadamente 40000 casos de salmoneloses (SILVA, 2007b). Dados recentes apontam para um crescimento do número de infecções por *Salmonella* a cada ano (FRANCO, 2004).

Para medidas de controle, o calor é uma forma eficiente, entretanto, algumas cepas são mais resistentes do que outras. O ambiente influencia na resistência da *Salmonella*: ambientes úmidos diminuem a resistência do micro-organismo quando comparados à ambientes com baixa umidade (FRANCO, 2004). A Resolução nº 12 de 2001 da Anvisa estabelece ausência de *Salmonella* em 25 g de alimento, para queijos de alta umidade e embutidos frescos (BRASIL, 2001).

Diferentes sorotipos de *Salmonella* têm sido identificados em animais com salmonelose. Não existe espécie-especificidade na infecção dos animais pelos mais de 2000 diferentes sorotipos descritos para o micro-organismo, embora evidências apontem certa seletividade de determinados sorotipos nas infecções em animais. No entanto, tem-se observado o predomínio do sorovar Typhimurium na salmonelose em animais (ACHA; SZYFRES 2003; QUINN et al., 2005).

Salmonella enteritidis é um sorotipo que nos anos 1980, em países da Europa, foi o mais comum causador de surtos de diarreia associados ao consumo de ovos crus e carnes mal cozidas de aves (CDC, 2003). Causa febre, cólicas abdominais e diarreia, que pode apresentar grumos de sangue. É um sorotipo que demonstra certa resistência a antimicrobianos e algumas cepas apresentavam multirresistência (CONNOR, 2005). Esse sorotipo predominou entre todos os sorovares isolados entre 1994 e 1999 pelo Laboratório de Ornitopatologia da FMVZ de Botucatu/SP, e correspondeu a 75,6% dos 45 sorotipos isolados de aves naquele período (ANDREATTI FILHO et al., 2001).

A grande maioria dos sorotipos de salmonelas são patogênicos para o homem, de forma que os sintomas clínicos podem ser divididos em três grupos (CONNOR, 2005). O primeiro, é a febre tifoide, causada por *S. Typhi*, que atinge somente o homem e não possui reservatórios em animais, por isso, a infecção se dá entre as pessoas, pelo consumo de água contaminada ou alimentos contaminados por fezes de humanos. Uma vez contaminada, a pessoa pode ser portadora dessa bactéria por vários anos. A febre tifoide é caracterizada por septicemia, febre contínua, cefaleia, diarreia e pode evoluir para óbito. Quando contami-

nada, a infecção pode durar até oito semanas. No segundo grupo, está a febre entérica, que é ocasionada pela *S. Paratyphi* A, B e C e é mais branda que a febre tifoide, tendo duração média de três semanas, podendo ser causada pelo consumo de água e alimentos, principalmente vegetais e leite cru, mariscos e ovos. No terceiro grupo estão as infecções entéricas, causadas por outros tipos de *Salmonella*. São raros os casos clínicos fatais e, geralmente, é dispensada a antibioticoterapia. Os alimentos mais incriminados são a carne bovina, as aves, os suínos e os ovos crus.

2.1.3 ENTEROCOCCUS SP.

Os enterococos são células esféricas ou ovoides, dispostos geralmente em pares ou cadeias curtas em meio líquido. Algumas vezes podem apresentar-se em formas cocobacilares, quando o crescimento ocorre em ágar. São organismos Gram-positivos e podem ser móveis, apresentando poucos flagelos e ausência de cápsula (KONEMAN; ALLEN, 2001). São ainda anaeróbios facultativos e a temperatura ótima de crescimento é de 35 °C, embora a maioria dos micro-organismos se desenvolva entre 10 e 45 °C. Apresentam crescimento rápido em meios de cultura, e podem ser cultivados na presença de altas concentrações de sal (NaCl a 6,5%), toleram sais biliares a 40% e podem hidrolisar a esculina. Essas propriedades básicas podem ser utilizadas para distinguir enterococos de outros cocos Gram-positivos (SHANKAR et al., 1999).

A crescente importância dos enterococos como patógenos nosocomiais tem sido a habilidade natural de adquirir plasmídeos, ou seja, elementos extra cromossômicos que codificam características que permitem a sobrevivência ou vantagens quanto ao crescimento desses micro-organismos em ambientes não usuais e/ou estressantes, como o ambiente hospitalar. Linhagens virulentas podem ser resultantes da aquisição de genes pela troca genética e isso pode estar relacionado à diversidade de elementos genéticos (plasmídeos) (SHANKAR et al., 1999; RIBOLDI, 2009).

Por colonizar o trato intestinal, tem-se sugestionado como um potencial risco sanitário, justificando seu uso como indicador de contaminação fecal (ARIAS et al., 2010), além de promover a deterioração de alguns alimentos. Existem 14 espécies descritas de *Enterococcus* sp., sendo *E. faecalis* e *E. faecium* os dois integrantes principais que constituem o grupo dos mais importantes agentes bacterianos relacionados com as infecções nosocomiais. Além disso, *E. faecalis* é a principal espécie isolada do trato gastrointestinal humano e também a espécie *E. faecium* pode ser encontrada em proporções variadas (SHANKAR et al., 1999).

As infecções mais associadas com os enterococos são as do trato urinário, intra-abdominais, pélvicas, bacteremia, endocardite, cutâneas, neonatais, do sistema nervoso central e do trato respiratório (GOULD et al., 2004).

3 ANÁLISES MOLECULARES NA IDENTIFICAÇÃO DE PATÓGENOS ALIMENTARES

A análise microbiológica de um produto alimentício pode ser conduzida para investigar a presença ou ausência de micro-organismos nesse produto ou para quantificar os micro-organismos presentes e para identificar e caracterizar as diferentes espécies microbianas. Inúmeros métodos laboratoriais de análise podem ser utilizados e, atualmente, esses métodos são comumente divididos em métodos “convencionais” e métodos “rápidos” (FRANCO, 2004).

Os métodos convencionais recebem essa denominação porque foram desenvolvidos há muitos anos e desde então vêm sendo empregados como oficiais na maioria dos laboratórios brasileiros e também em outros países. Esses métodos de detecção de bactérias em alimentos envolvem etapas de pré-enriquecimento e enriquecimento seletivo, seguidos por testes de identificação morfológica, bioquímica e imunológica. Apesar de serem bem estabelecidos e de requererem materiais de consumo mais baratos, tais procedimentos apresentam algumas desvantagens como o intenso trabalho e a espera pelos resultados finais por vários dias. Muitos trabalhos vêm sendo desenvolvidos na busca de métodos rápidos e confiáveis para a detecção de micro-organismos em alimentos (LANTZ; HAHN-HÄGERDAL; RADSTRÖM, 1994).

Os métodos rápidos surgiram a partir da década de 1970, como consequência da necessidade de se abreviar o tempo necessário para a obtenção de resultados analíticos, melhorar a produtividade laboratorial, simplificar o trabalho e reduzir custos. Além dessas vantagens, alguns desses métodos apresentam maior sensibilidade e especificidade que os métodos convencionais (FRANCO, 2004). Entre os métodos rápidos, está a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

A PCR tem sido estabelecida em diagnósticos microbiológicos como uma valiosa alternativa para os métodos convencionais. Rapidez, bom limite de detecção, seletividade e potencial para a otimização são as maiores vantagens desse método. Entretanto, existem algumas variáveis a serem consideradas no uso da PCR, como o custo do alto investimento tecnológico, a necessidade de aprovação oficial, regulamentos e instruções padronizadas (MALORNY et al., 2003). Por meio dessa técnica, é possível identificar micro-organismos a partir de seu

material genético. Repetidas séries do ciclo envolvem a desnaturação do DNA molde, o anelamento dos *primers* e a extensão dos *primers* anelados pelo DNA polimerase, resultando em uma acumulação exponencial de fragmentos específicos. Devido à extensão do *primer*, os produtos sintetizados em um ciclo podem servir de molde para os próximos, e o número de cópias do fragmento alvo dobra a cada ciclo. A complementaridade entre as bases nitrogenadas constituintes dos ácidos nucléicos e as variações de temperatura permitem a reprodução *in vitro* do processo que ocorre *in vivo* (BROWN, 2003). É utilizado um oligonucleotídeo iniciador (*primer*) específico para a identificação do gênero bacteriano, dando uma precisão na identificação de micro-organismos em alimento.

Os componentes essenciais para a PCR são a DNA polimerase termoestável, o *primer*, desoxinucleotídeos (dNTPs), DNA molde, íons magnésio, tampão e água. Geralmente o volume total de reação varia de 20 a 100 µl. A PCR envolve ciclos repetidos de altas temperaturas para separar os filamentos de DNA, temperaturas relativamente baixas para permitir a hibridização dos *primers* (anelamento) com as regiões complementares do DNA alvo, e uma temperatura intermediária para a extensão da fita. A variação da temperatura é realizada com auxílio do termociclador. É essencial que o termociclador promova aquecimento e resfriamento idênticos, fornecendo resultados uniformes em todas as reações (ATLAS; BEJ, 1994).

Usualmente a PCR é empregada na análise de patógenos em alimentos a partir de amostras enriquecidas, quando teoricamente o micro-organismo atinge uma alta concentração, permitindo a detecção de forma adequada (LANTZ; HAHN-HÄGERDAL; RADSTRÖM, 1994). A PCR, a partir de amostras sem enriquecer, ou seja, diretamente do alimento, é uma alternativa viável pela maior praticidade e rapidez. Segundo Myint et al. (2006), a análise direta do DNA de micro-organismos do próprio alimento é realizada em menos de dois dias, comprovando a praticidade da PCR como ferramenta no monitoramento de patógenos numa indústria de alimentos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Foram analisadas 14 amostras de queijo tipo Minas Frescal, cinco de linguiça defumada e nove de linguiça fresca, adquiridas aleatoriamente na forma de consumidor em feiras livres na cidade de Londrina-PR, durante o ano de 2011. As amostras foram transportadas na própria embalagem até o Laboratório de Microbiologia da UTFPR – *campus* Londrina, onde foram preparadas para posteriores análises microbiológicas. As análises ocorreram no mesmo dia da

aquisição da amostra ou em um período máximo de 12 horas, sendo mantidas sob refrigeração.

4.1 ISOLAMENTO CONVENCIONAL

Para estudar um micro-organismo em particular é necessário separá-lo da população mista em que se encontra. Para tanto, há necessidade de utilizar técnicas de isolamento que resultem em cultivo puro.

4.1.1 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA DE *ESCHERICHIA COLI*

O isolamento de *Escherichia coli* foi realizado segundo a metodologia descrita por Kornacki e Johnson (2001), baseado no método do Número Mais Provável.

4.1.2 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA DE *SALMONELLA*

O isolamento de *Salmonella* seguiu protocolo descrito FDA (2006). Esse método consiste em um pré-enriquecimento seguido de um enriquecimento e o plaqueamento seletivo diferencial. Posterior a isso, foram executados os testes bioquímicos de confirmação.

4.2.3 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA DE *ENTEROCOCCUS*

O isolamento de *Enterococcus* consistiu em realizar um pré-enriquecimento seguido de um enriquecimento e o plaqueamento seletivo diferencial em Ágar Kanamicina Bile Esculina (KEA). Testes confirmatórios foram de catalase, crescimento em 10 e 45 °C, em meio de cultura hipersalinizado (NaCl 6,5%).

4.2 IDENTIFICAÇÃO GENOTÍPICA

A identificação genotípica é uma técnica muito utilizada para a confirmação de micro-organismos patógenos em alimentos. Para tanto, o DNA deve estar livre do interior celular e a técnica de identificação mais aplicada é a Reação em cadeia da Polimerase (PCR).

4.2.1 EXTRAÇÃO DE DNA DE *E. COLI* E *SALMONELLA*

O DNA genômico de *E. coli* foi isolado utilizando-se a metodologia descrita por Farooq (2009), com modificações. Uma alçada dos isolados de *E. coli*, provenientes de crescimento em Ágar BHI, foi inoculada em 3 ml de caldo BHI e esses tubos incubados por aproximadamente 24h a 37 °C. Após esse período,

o conteúdo total foi transferido para tubos de microcentrífuga e centrifugados a 10.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento lavado com água bi-destilada estéril, e novamente submetido à centrifugação a 10.000 rpm por 10 minutos. O sedimento foi ressuspensão em 500 µl de solução de lise (Tris-HCl 1,0 M, pH 8,0; EDTA 0,5 M; NaCl 3,5 M; SDS 10%) e 5 µL de proteínase K (20 mg/ml). O tubo foi deixado em banho-maria a 55 °C por no mínimo 1 h. Após isso, foi acrescentado o mesmo volume de fenol-clorofórmio, a fim de desproteinar a solução. Finalmente, o DNA foi desidratado com etanol gelado e ressuspensão em 50 µL de água bi-destilada estéril e conservado a -20°C.

4.2.2 EXTRAÇÃO DE DNA DE *ENTEROCOCCUS*

O DNA genômico dos isolados foi extraído utilizando-se a técnica da lise térmica (HAGEN et al., 2002). Com auxílio de uma alça previamente flambada, os isolados de *Enterococcus* sp. foram inoculados em tubos contendo meio Infusão Cérebro Coração (BHI) e incubados por aproximadamente 24 h a 37 °C. Para a extração do DNA foi coletada uma colônia de cada isolado e estas foram ressuspensas em tubo de microcentrífuga, contendo aproximadamente 100 µL de água estéril. Os tubos foram incubados em banho contendo água a uma temperatura de aproximadamente 100 °C por 30 minutos. Após, foram centrifugados por 10 minutos a 12000 rpm, 3 µL de cada sobrenadante, contendo o DNA genômico, foi utilizado na reação de amplificação por PCR.

4.2.3 EXTRAÇÃO DE DNA BACTERIANO DIRETO DO ALIMENTO

Para a extração do DNA genômico bacteriano a partir de amostras de alimentos, utilizaram-se duas metodologias designadas M1 e M2.

Metodologia M1: as amostras de alimentos foram submetidas à incubação em caldo de enriquecimento por 24 horas a 37 °C. A partir desse crescimento, foi retirado 1 ml e centrifugado a 15.000 g por 10 minutos. As células foram lavadas duas vezes com salina tamponada fosfatada estéril (PBS, pH 7,2). O DNA foi extraído por meio de aquecimento a 95 °C por 15 minutos em 20 µL de solução de lise 1:1 (0,125% SDS e 0,05M NaOH) e centrifugação a 15.000 g por 5 min. O sobrenadante foi coletado e armazenado em freezer.

Metodologia M2: a partir da primeira diluição da amostra, retirou-se 2 ml e procedeu-se a centrifugação a 15.000 rpm por 10 minutos. As células foram lavadas duas vezes com salina tamponada fosfatada estéril (PBS, pH 7,2). Acrescentaram-se 200 µL de água deionizada esterilizada. O DNA genômico foi extraído

por meio de aquecimento a 95 °C por 15 minutos. O sobrenadante foi coletado e armazenado em freezer.

4.3 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

Os *primers* utilizados neste trabalho estão descritos na Tabela 1. Utilizaram-se 125mM de cada um dos *primers*, 2 µL de solução tampão para PCR, 2,5mM de cloreto de magnésio, 109µM de dNTPs mix, 0,5U de *Taq* DNA polimerase e 1µl do DNA alvo (10-20ng·µl⁻¹) em 20µl de volume final. A amplificação dos fragmentos alvo foi realizada em termociclador (Biocycler), por meio de desnaturação inicial do DNA a 94 °C por 5minutos, seguida de 35 ciclos (94 °C - 1 minuto; 55 °C - 1 minuto e 72 °C - 1minuto), e de extensão final a 72 °C por 10 minutos. Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% contendo brometo de etídeo e visualizados sob iluminação ultravioleta. O marcador de massa molecular utilizado foi o 100pb DNA Ladder (Invitrogen®).

Tabela 1 - Oligonucleotídeos utilizados na reação de PCR para identificação de *E. faecalis*, *E. faecium*, *Escherichia coli* (ETEC, EPEC) e *Salmonella* spp.

Micro-organismo	Oligonucleotídeos (primers)	Produto amplificado
<i>E. faecalis</i>	+ATCAAGTACAGTTAGTCT -ACGATTCAAAGCTAACTG	941 pb
<i>E. faecium</i>	+TAGAGACATTGAATATGCC -TCGAATGTGCTACAATC	550 pb
<i>E. coli</i> EPEC	+GAC CCG GCA CAA GCA TAA GC -CCA CCT GCA GCA ACA AGA GG	384 pb
<i>E. coli</i> ETEC	+CAC CCG GTA CAA GGC AGG ATT -ATT TTT ACT TTC TGT ATT AGT CTT	190 pb
<i>Salmonella</i> sp.	+AAACGTTGAAAACTGAGGA - TCGTCATTCCATTACCTACC	119

Fonte: Autoria própria (2011).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo foram analisadas 14 amostras de queijo, cinco de linguiça defumada e nove de linguiça fresca. As 28 amostras foram submetidas às análises microbiológicas para detecção de *Enterococcus* sp. (*E. faecium* e *E. faecalis*), *Salmonella* spp. e *E. coli* (ETEC e EPEC). Na tabela 2, encontram-se os resultados para *Enterococcus* sp. O cálculo do número de UFC/g de ali-

mento, descrito por Silva et al. (2007b), foi em função do número de colônias típicas contadas, diluição inoculada e percentagem de colônias confirmadas. Oito amostras de queijo (57%), duas de linguiça defumada (14%) e quatro de linguiça fresca (28%) apresentaram contaminações por *Enterococcus* sp., variando de 6×10^3 a $2,5 \times 10^4$ UFC/g.

Tabela 2 – Resultados de enumeração de *Enterococcus* sp. a partir de amostras de alimentos

AMOSTRA/ UFCg	Isolados							
Queijo	E17Q.10	E18Q.10	E19Q.10	E20Q.10	E22Q.10	E25Q.10	E27Q.10	E30Q.11
	$1,65 \times 10^4$	$1,25 \times 10^4$	$2,1 \times 10^4$	$2,5 \times 10^4$	$1,65 \times 10^4$	$8,25 \times 10^3$	6×10^3	$1,9 \times 10^4$
Linguiça Defumada	E1e.10	E1e.10						
	$6,6 \times 10^3$	9×10^3						
Linguiça Fresca	E6f.11	E7f.11	E8f.11	E9f.11				
	$1,5 \times 10^4$	$2,5 \times 10^3$	$6,6 \times 10^3$	$8,7 \times 10^3$				

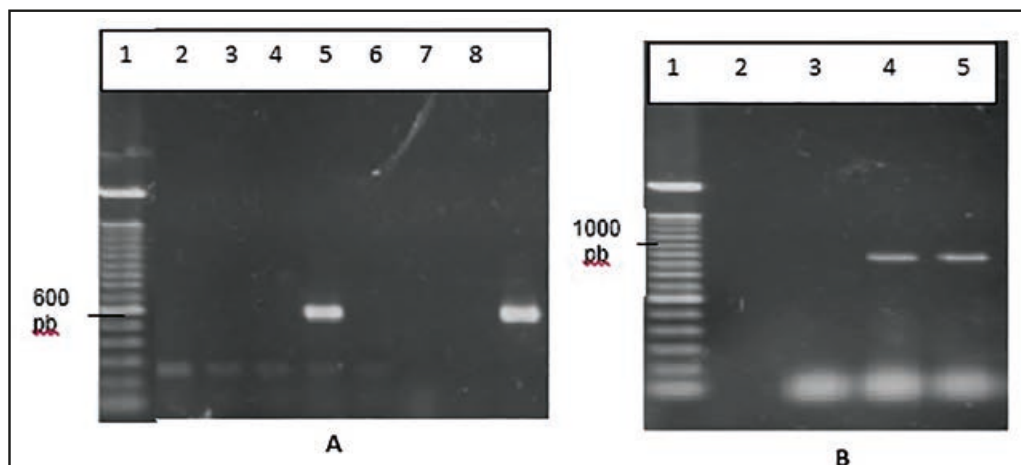
UFC: Unidade Formadora de Colônia; E: *Enterococcus*; Q: Queijo; e: Linguiça defumada; f: Linguiça Frescal.

Fonte: Autoria própria (2011).

Nos testes presuntivos, *Enterococcus* sp. foi detectado em valores de $6,0 \times 10^3$ a $2,5 \times 10^4$ UFC/g de queijo analisados, $6,6 \times 10^3$ a $9,0 \times 10^3$ nas amostras de linguiça defumada e $2,5 \times 10^3$ a $1,5 \times 10^4$ nas de linguiça fresca. Enfatizando que os componentes adicionados no preparo da linguiça, como sal e pimenta, não interferiram na viabilidade celular deste micro-organismo.

As cepas isoladas que apresentaram características de *Enterococcus* sp. nos testes bioquímicos seguiram processo de extração de DNA para posterior análise molecular por PCR. Para as análises moleculares de determinação da espécie de *E. faecium* e *E. faecalis* foram utilizadas 17 colônias escolhidas aleatoriamente. Um total de 29% das colônias submetidas à amplificação para determinação da espécie *E. faecium* apresentaram um amplicon de 550 pb, característico dessa espécie (Figura 1A). As colônias que não apresentaram amplificação para essa espécie foram submetidas à amplificação para a espécie *E. faecalis*. Duas colônias (13%) foram amplificadas para essa espécie (Figura 1B), apresentando um amplicon de 941pb. As demais colônias devem pertencer a outras espécies do gênero *Enterococcus*. Foram identificadas as espécies *E. faecium* e *E. faecalis*. A técnica de PCR foi importante para distinguir as espécies de *Enterococcus* sp., uma vez que os testes bioquímicos de identificação somente identificaram o gênero.

Figura 1 – (A) Gel de agarose a 1,5% demonstrando o resultado de amplificação do gene espécie específico para *E. faecium* (550 pb). Canaletas 1 – peso molecular 1Kb; 2 a 7 – colônias isoladas de queijo; 8 a 9 – colônias isoladas de linguiça; (B) amplificação do gene espécie específico para *E. faecalis* (941 pb). Canaletas 1 – peso molecular 1Kb; 2 a 4 – colônias isoladas de queijo; 5 – colônia isolada de linguiça.



Fonte: Autoria própria (2011).

A presença dos enterococos na microbiota do trato gastrintestinal de seres humanos e animais explica a ocorrência em alimentos de todos os tipos. Uma vez presentes nos alimentos, esses micro-organismos são capazes de sobreviver e se multiplicar, podendo resistir a alguns processos tecnológicos de preparação e preservação dos alimentos (GIRAFFA, 2002). Fujimoto et al. (2011) obtiveram resultados semelhantes em queijos de coalho provenientes de duas regiões de produção artesanal do estado do Ceará. Por meio da técnica de PCR, foi identificada presença de 90% de *E. faecium*, 2,7% de *E. faecalis* e 7,3% de *Enterococcus* spp.

Riboldi et al. (2009) isolaram 56 cepas de *Enterococcus* sp. de diversos vegetais e, utilizando-se de PCR, foram confirmadas contaminações por *E. faecalis*, *E. faecium* e *Enterococcus* spp. Já um estudo realizado por Cariolato et al. (2008) relatou a presença de *E. faecalis* e *E. faecium* isolados de produtos lácteos e identificados por PCR.

Na tabela 3, encontram-se as amostras que apresentaram presença para *Salmonella* spp. nos testes presuntivos, ou seja, nos meios de cultura utilizados apresentaram colônias com características típicas para *Salmonella*. No entanto, nos testes moleculares (PCR) não foi verificada a presença de *Salmonella* spp., denotando um resultado satisfatório por apresentar-se dentro dos padrões

estabelecidos pela Anvisa (BRASIL, 2001). O *primer* utilizado neste estudo identifica o gênero *Salmonella* sp.

Tabela 3 – Presença de *Salmonella* spp. a partir de amostras de alimentos

AMOSTRA/ UFC g	Isolados					
	S19Q.10	S22Q.10	S23Q.10	S24Q.10	S28Q.10	S30Q.10
Queijo	S19Q.10	S22Q.10	S23Q.10	S24Q.10	S28Q.10	S30Q.10
Linguiça Defumada	S1e.10	S1e.10	S3e.10	S4e.10	S5e.10	
Linguiça Fresca	S3f.11	S5f.11	S8f.11	E9f.11		

S: *Salmonella*; Q: Queijo; e: Linguiça defumada; f: Linguiça Frescal.

Fonte: Autoria própria (2011).

Ávila e Gallo (1996) em trabalho realizado com leite cru, leite pasteurizado tipo C e queijo Minas Frescal não encontraram a presença de *Salmonella*, entretanto, algumas culturas apresentaram características bioquímicas similares a desse micro-organismo; estas, isoladas, não se confirmaram quando submetidas a testes sorológicos. Esse fato confirma que mesmo se utilizando da metodologia padrão considerada mais indicada para o isolamento de *Salmonella*, não há um meio de cultivo seletivo ideal para o seu isolamento. Dionizio et al. (2003) atribuem tal fato pela grande multiplicação de coliformes nos meios seletivos para *Salmonella* spp.

Nos testes presuntivos para *Escherichia coli*, foi detectada a presença em 14,28% das amostras de queijo em quantidades que variaram de 460 a 1100 NMP/g de alimento. Em linguiça fresca a presença do micro-organismo foi de 77,78% das amostras em valores de 43 a >1100 NMP/g. Já em linguiça defumada não foi verificada a presença de *E. coli*.

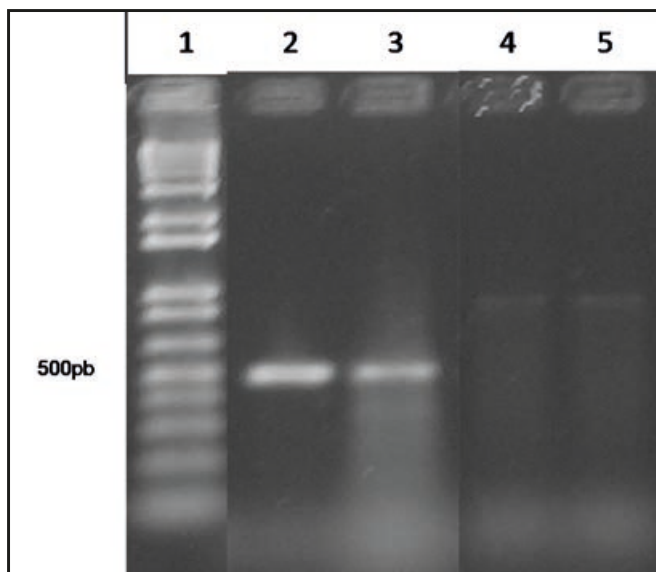
Para as análises moleculares de determinação de ETEC e EPEC foram utilizadas nove colônias escolhidas aleatoriamente. Os oligonucleotídeos para EPEC referem-se ao gene *eaf* que conferem uma proteína fimbrial específica dessa cepa. Já para ETEC, o gene amplificado seria o que transcreve a proteína termo lábil (LT) dessa cepa.

Os testes bioquímicos identificaram a presença de *E. coli* nas amostras de queijo, linguiça defumada e fresca. Após a aplicação da PCR, surgiram bandas referentes à EPEC e ETEC, contudo, bandas inespecíficas também foram visualizadas. Provavelmente a temperatura de pareamento não foi suficiente para essas cepas. Estudos posteriores serão realizados aumentando a temperatura.

A prevenção de contaminações de queijos tipo Minas Frescal depende de medidas sanitárias capazes de evitar o contágio por material fecal de origem humana e animal, como a lavagem das mãos em toda a cadeia de produção dos queijos, a utilização de água tratada e o tratamento de esgotos (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

Foi realizada neste estudo a extração de DNA bacteriano direto do alimento. Os testes de amplificação para as espécies de *Enterococcus* encontram-se na Figura 5. Observou-se que a metodologia é eficiente e que não há diferença se a extração é proveniente da metodologia 1 (M1) ou 2 (M2).

Figura 5 - Gel de agarose a 1,5% demonstrando o resultado de amplificação do gene espécie específico para *E. faecium* (550 pb) e *E. faecalis* (941 pb). Canaletas 1 – peso molecular 100 pb; 2 e 4 – metodologia de isolamento de DNA (M1); 3 e 5 – metodologia de isolamento de DNA (M2)



Fonte: Autoria própria (2011).

O diagnóstico microbiológico em amostras de alimentos pode ser demorado, ocorrendo em diversas etapas, levando dias até o resultado final. Por isso, a técnica da PCR com a extração de DNA direta do alimento tem sido uma alternativa, pois, além da redução do tempo e custo com reagentes, é uma técnica de elevada confiabilidade de resultados.

Santos et al. (2001) utilizaram com sucesso a técnica de PCR direta de ovos contaminados artificialmente com *Salmonella* sp. Já Jordão Júnior et al. (2005) isolaram *Mycobacterium bovis* diretamente do leite.

6 CONCLUSÃO

Esta pesquisa confirmou a presença de *Enterococcus* sp. (*E. faecium* e *E. faecalis*) em queijos Minas Frescal e em linguiças defumadas e frescas, comercializados em feiras livres na cidade de Londrina-PR. A presença de *E. coli* foi confirmada, com bandas referentes à EPEC e ETEC, contudo, bandas inespecíficas também foram visualizadas na PCR. Os resultados apresentados pela microbiologia tradicional e pela detecção molecular não foram iguais para *Salmonella* spp., confirmando a teoria de que as metodologias tradicionais não são suficientemente seguras na confirmação de patógenos, como no caso dessa *Salmonella*, que fornece resultados falso-positivos com frequência. A PCR aplicada diretamente do alimento, a partir do meio de pré-enriquecimento, foi adaptada com sucesso, não diferindo das metodologias de extração utilizadas.

Dada a importância que as toxinfecções alimentares assumem no contexto da saúde pública, este trabalho apresentou uma alternativa de diagnóstico na identificação de patógenos. O curto tempo de execução e a confiabilidade da PCR tornam-na uma excelente ferramenta em diagnóstico microbiológico.

REFERÊNCIAS

ACHA, P.N.; SZYFRES, B. Salmonellosis. In: ACHA, P. N.; SZYFRES, B. (Ed.). *Zoonosis y Enfermedades Transmisibles Comunes al Hombre y a los Animales*. 3. ed. Washington: Organización Panamericana de la Salud, 2003. p.242-260.

ANDREATTI FILHO, R. L. Sorovares de *Salmonella* isolados de materiais avícolas no período de 1994 a 1999. *Revista de Educação Continuada*, v. 4, p. 90-101, 2001.

ARIAS CA, CONTRERAS GA, MURRAY BE. Management of multidrug-resistant enterococcal infections. *Clinical Microbiology and Infection*, v.16, p.555-562, 2010.

ATLAS, R. M.; BEJ, A. K. Polymerase Chain Reaction. In: GERHARDT, P.; MURRAY, R. G.; WOOD. W. A. *Methods for General and Molecular Bacteriology*. American Society of Microbiology, 1994. p. 418-435.

ÁVILA, C. R.; GALLO, C. R. Pesquisa de *Salmonella* spp. em leite cru, leite pasteurizado tipo C e queijo “Minas Frescal” comercializados no município de Piracicaba - SP. *Scientia Agricola*, Piracicaba, v. 53, p. 15-19, 1996.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 12, de 2 de janeiro de 2001. *Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos*. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_01rdc.htm>. Acesso em: 1 out. 2010.

BROWN, T. A. A reação em cadeia da polimerase. In: _____. *Clonagem gênica e análise de DNA: uma introdução*. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2003. p. 187-201.

CARIOLATO, D. et al. Occurrence of Virulence Factors and Antibiotic Resistances in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* Collected from Dairy and Human Samples in North Italy. *Food Control*, v. 19, p. 886-892, 2008.

CDC (Centers for Disease Control and Prevention). Outbreaks of *Salmonella* Serotype Enteritidis Associated with Eating Shell Eggs – United States, 1999-2001. *MMWR*, v. 51, p. 1149-1152, 2003.

CONNOR, B. A.; SCHWARTZ, E. Typhoid and Paratyphoid Fever in Travelers. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 5, p. 623-628, 2005.

DIONIZIO, F. L. et al. Presença de *Salmonella* sp. em queijos Minas Frescal e requeijão em barras produzidos artesanalmente na região de Salinas, norte de Minas Gerais. In: CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE HIGIENISTAS DE ALIMENTOS, I.; CONGRESSO BRASILEIRO DE HIGIENISTAS DE ALIMENTOS, 7., 2003, Belo Horizonte. *Anais*. São Paulo, 2003. p. 57.

FAROOQ, S et al. Isolation of Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* and Shiga Toxin 1 and 2f-producing *Escherichia coli* from Avian Species in India. *Letters in Applied Microbiology*, v. 48, p. 692-697, 2009.

FRANCO, B. D. G. M. Critérios microbiológicos para avaliação da qualidade de alimentos. In: FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. *Microbiologia dos alimentos*. São Paulo: Atheneu, 2004. p. 149 - 154.

FUJIMOTO, G. *Estudo de fatores de virulência e propriedades tecnológicas de culturas de Enterococcus spp. isoladas de queijo de coalho*. Dissertação (Mestrado) – Unicamp, 2011.

FURTADO, M. M. Queijo do Serro: tradição na história do povo mineiro. *Rev. Inst. Lat. Cândido Tostes*, v. 35, p. 33-36, 1980.

GIRAFFA, G. Enterococci from Foods. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 26, p. 163-171, 2002.

GOULD, C.V. et al. Chloramphenicol Resistance in Vancomycin-resistant Enterococcal Bacteremia: Impact of Prior Fluoroquinolone Use. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, v. 25, p. 138-145, 2004.

HAGEN T. J. et al. A 3-Hydroxy-4-methyl-5-pentyl-2-iminopyrrolidine: a Potent and Highly Selective Inducible Nitric Oxide Synthase Inhibitor. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 12, p. 3337-3339, 2002.

JAY, J. M. *Microbiología moderna de los alimentos*. 3. ed. Zaragoza: Editorial Acribia, 1994. p. 803.

JORDÃO JUNIOR, C. M. et al. Padronização da técnica de PCR na detecção de *Mycobacterium bovis* diretamente no leite. *Alim. Nutr.*, Araraquara, v. 16, n. 1, p. 51-55, jan./mar. 2005.

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. T. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Rev.*, v. 2, p. 123-140, 2004.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D. *Diagnóstico microbiológico*. Texto e atlas colorido. 5. ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 2001. p. 589-685.

KORNACKI, J. L.; JOHNSON, J. L. Enterobacteriaceae, Coliforms, and *Escherichia coli* as Quality and Safety Indicators. In: DOWNES, F. P.; ITO, K. (Ed.). *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. 4. ed. Washington: American Public Health Association, 2001. p. 69-82.

LANDGRAF, M. Micro-organismos indicadores. In: FRANCO, Bernadette D. G. M.; LANDGRAF, Mariza. *Microbiologia dos alimentos*. São Paulo: Atheneu, 2005. p. 27-31.

LANTZ, P.; HAHN-HÄGERDAL, B.; RADSTRÖM, P. Sample Preparation Methods in PCR-based Detection of Food Pathogens. *Trends in Food Science & Technology*, v. 5, p. 384-389, 1994.

MALORNY, B. et al. Standardization of Diagnostic PCR for the Detection of Foodborne Pathogens. *International Journal of Food Microbiology*, v. 83, p. 39-48, 2003.

MYINT, M.S. et al. The Effect of Pre-enrichment Protocol on the Sensitivity and Specificity of PCR for Detection of Naturally Contaminated *Salmonella* in Raw Poultry Compared to Conventional Culture. *Food Microbiology*, v. 23, p. 599-604, 2006.

QUINN P, J. et al. *Microbiologia veterinária e doenças infecciosas*. Porto Alegre: Artmed, 2005.

RIBOLDI, G. P. et al. Antimicrobial Resistance Profile of *Enterococcus* spp. Isolated from Food in Southern Brazil. *Braz. J. Microbiol.*, São Paulo, v. 40, n. 1, p. 125-128, 2009.

SANTOS, L. R. et al. Polymerase Chain Reaction (PCR) for the Detection of *Salmonella* in Artificially Inoculated Chicken Meat. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, São Paulo, v. 43, n. 5, p. 247-250, 2001.

SHANKAR, V. et al. Infection-derived *Enterococcus faecalis* Strains Are Enriched in *esp*, a Gene Encoding a Novel Surface Protein. *Infection and Immunity*, v. 67, p. 193-200, 1999.

SILVA, N. et al. Contagem de coliformes totais, coliformes termotolerantes e *Escherichia coli*. In: _____. *Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos*. 3. ed. São Paulo: Varela, 2007a. p. 119-135.

_____. Salmonella. In: _____. *Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos*. 3. ed. São Paulo: Varela, 2007b. p. 253-259.