**DESENVOLVIMENTO DE ENSAIO MOLECULAR PARA DETECÇÃO DO GENE QUE CODIFICA A TOXINA ESTAFILOCÓCICA DO CHOQUE TÓXICO (TSST- 1) A PARTIR DE AMOSTRAS DE LEITE SEM CULTURA MICROBIOLÓGICA** *Staphylococcus***-ESPECÍFICA**

**Área Temática: CIÊNCIAS AGRÁRIAS.**

**Autores**

Maria Eduarda Seixas Cruz Barros, UFNT, [maria.barros@ufnt.edu.br](mailto:maria.barros@ufnt.edu.br)

[José Carlos Ribeiro Júnior, UFNT,](mailto:) [jcribeiro@uft.edu.br](mailto:jcribeiro@uft.edu.br)

1. **Resumo**

Em alimentos, patógenos como *Staphylococcus aureus* podem produzir toxinas estafilocócicas, como a do choque tóxico (TSST-1), que podem comprometer a segurança para o consumo mesmo nos derivados tratados termicamente. O objetivo deste estudo foi validar um ensaio biomolecular para detecção do gene *tst*, que codifica a síntese da TSST-1, em amostras de leite independentemente de cultura microbiológica específica. Um isolado sabidamente positivo para o gene *tst* foi preparado até a concentração 2 da escala de McFarland. Esse inóculo foi decimal e sequencialmente diluído até a concentração . As diluições foram plaqueadas em duplicata pelo método *pour plate* em ágar padrão para contagem e o resultado determinado em 3,1 x UFC/mL. Um mL de cada diluição foi submetido à extração de DNA e PCR para o gene *tst*, de forma a determinar a sensibilidade analítica do ensaio molecular. Paralelamente, uma alíquota de 1 mL do inóculo na concentração 2 da escala de McFarland foi adicionado à 99 mL de leite em pó desnatado reconstituído a 10% estéril. A PCR qualitativa detectou até 3,1 isolados por mL (1 mL da diluição ). O leite inoculado também foi diluído e a contagem foi de 2,6 x UFC/mL após o plaqueamento. As diluições do leite também foram submetidas à PCR para o gene *tst,* para o qual foi determinada a sensibilidade de 2,6x UFC/Ml. A pesquisa molecular do gene *tst* de *S. aureus* em amostras de leite apresentará resultados positivos somente se este estiver presente em grandes quantificações. Interferências da matriz de extração foram identificadas e alternativas como o pré-enriquecimento da amostra podem ser eficazes para o diagnóstico direto do patógeno.

**Palavras-chave:** Microbiologia, *Staphylococcus aureus*, toxina estafilocócica.

1. **Introdução**

O presente trabalho foi desenvolvido no período de outubro de 2023 a outubro de 2024 no Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Universidade Federal do Norte do Tocantins, com o auxílio de toda a equipe, incluindo estagiários, técnica e professor responsável. Na microbiologia de alimentos, a PCR tem sido uma ferramenta essencial para o diagnóstico de toxinfecções, afecções que podem acometer tanto humanos quanto animais a partir da ingestão das toxinas em alimentos contaminados por bactérias patogênicas, em especial a Toxina Estafilocócica do Choque Tóxico (TSST-1). Para o desenvolvimento do projeto, foi realizada cultura e isolamento de *Sthaphylococcus aureus* seguida da diluição para posterior avaliação em PCR. A PCR apresenta na atualidade alta relevância diagnóstica, fato que demonstra a necessidade de estudos sobre a sua eficácia e no qual se fundamenta a execução desta pesquisa.

1. **Objetivos**

**Objetivo geral**

O presente trabalho teve por objetivo de desenvolver um ensaio biomolecular sensível e específico para a pesquisa direta do gene que codifica a TSST-1 em amostras de leite fluido independentemente da cultura microbiológica específica para *S. aureus*.

**Objetivos específicos**

Verificar a sensibilidade analítica da PCR clássica para a detecção do gene *tst* em concentrações conhecidas de *S. aureus* positivos para TSST-1;

Extrair o gDNA total de amostras de leite previamente e após ao pré-enriquecimento inespecífico;

Verificar a sensibilidade da PCR para o gene *tst* na detecção de *S. aureus* produtor de TSST-1 em amostras de leite antes e após o pré-enriquecimento;

Determinar possíveis interferentes da matriz de extração (leite total) na eficiência da PCR qualitativa; e,

Disponibilizar o ensaio molecular para a investigação de surtos de intoxicações alimentares para os serviços de saúde regionais.

1. **Metodologia**

Uma cepa de *S. aureus* sabidamente positiva para o gene *tst* depositada no biorrepositório do Laboratório de Microbiologia de Alimentos da UFNT foi recuperada do estoque glicerinado a – 20ºC em caldo BHI (Acumedia, Baltmore, USA) por 24h a 35ºC. A amostra foi purificada por repiques sucessivos em ágar padrão para contagem (PCA) (Acumedia) seguida da inoculação até o ponto 2 da escala de McFarland para estimativa de concentração em 2 log UFC/mL.

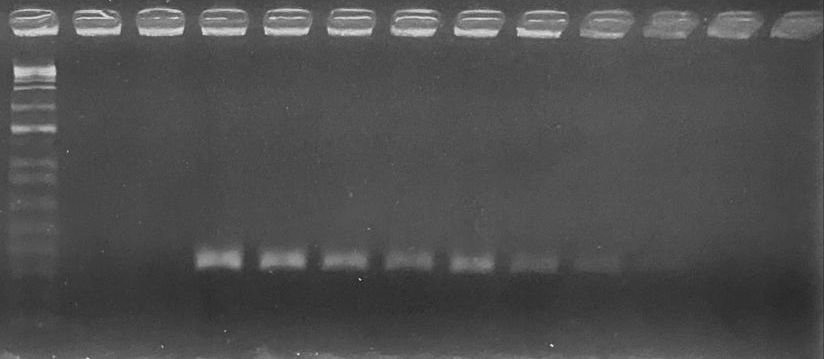
Essa solução foi decimal e sequencialmente diluída em salina (0,85%) peptonada (0,001%) até a 10-10. De cada diluição foram retiradas alíquotas de 1 mL imediatamente submetidas à extração de gDNA conforme o protocolo de Ribeiro Júnior et al. (2016). Simultânea e paralelamente, outra alíquota de 1mL de cada uma dessas diluições foi semeada em *pour-plate* em duplicata em ágar PCA, incubada por 48h a 35ºC para determinação da contagem em UFC/mL indicativa de cada concentração de gDNA extraído.

Cada amostra de gDNA da curva padrão anteriormente descrita foi avaliada em PCR qualitativa para o gene *tst*. A PCR foi executada com a seguinte constituição: 2 μL do produto da extração como DNA *target*, 100 nM de cada dNTP, 2,5 μL de tampão 10x, 75 mmol/L de MgCl2, 20 pmol/L de cada primer, 2.5 U de Platinum Taq DNA polymerase® (Invitrogen, Carlsbad, CA) e água ultrapura para completar o volume final de 25 μL. Foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores descritos por Mehrotra, Wang e Johnson (2000) para o gene *tst* (Foward: 5’-ACCCCTGTTCCCTTATCATC–3’ e Reverse: 5’- TTTTCAGTATTTGTAACGCC-3’) que determinam um *amplicon* de 326 pb.

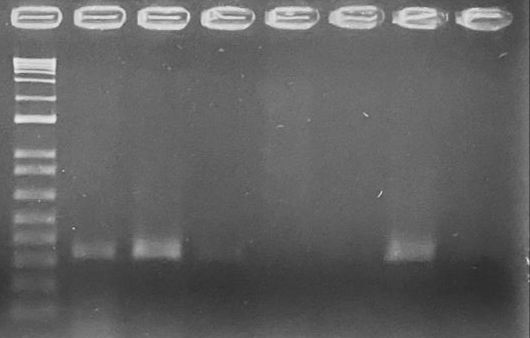
Foram utilizadas as seguintes condições de amplificação: 94ºC por 5 minutos, 35 ciclos de desnaturação a 92ºC por 2 minutos, anelamento a 57ºC por 1 minuto e extensão a 72ºC por 1 minuto, e um ciclo de extensão final a 72ºC por 7 minutos. Todas essas condições já foram validadas intra e interlaboratorial para esse ensaio. Os produtos da PCR foram eletroforizados em gel de agarose ultrapura (ThermoFisher Scientific, SP, BRL) a 2,5% por 50 minutos a 90V, corados em brometo de etídio por 20 minutos a 20 mg/mL e documentados sob luz ultravioleta. Os dados de resultados da PCR foram correlacionados com os resultados das contagens em UFC/mL pelo índice de correlação analítica no software SAS, determinando a sensibilidade da PCR em UFC/mL.

1. **Resultados**

Os resultados obtidos pelo PCR demonstraram que, nas soluções salinas contendo o inóculo diluído, a sensibilidade foi de 3,1 isolados por ml (1ml da diluição 10-8) para a detecção do gene *tst*, conforme Fig.1. Enquanto no leite inoculado a sensibilidade observada foi de, no mínimo, 2,6x107 UFC/ml, para a detecção deste mesmo gene. As diluições do leite também foram submetidas à PCR para o gene *tst*, para o qual foi determinada a sensibilidade de 2,6 x 104 UFC/mL (Fig. 2).



**Figura 1.** Sensibilidade da PCR para pesquisa do inóculo decimal e sequencialmente reduzindo a intensidade até concentração detectável de 3,1 UFC/mL.

****

**Figura 2.** Sensibilidade da PCR para pesquisa do gene tst em leite inoculado com S. aureus até a concentração detectável de 2,6 x 104 UFC/mL.

Tais dados revelaram que a pesquisa molecular do gene tst de *Staphylococcus* aureus em amostras de leite apresentará resultados positivos somente se este estiver presente em grandes quantificações. Assim, de acordo com os valores obtidos, conclui-se que não é confiável a utilização do PCR para detecção do gene *tst* em amostras de leite, pois sua sensibilidade não é suficiente, sendo necessária uma quantidade de UFC/ml ainda maior do que aquela capaz de instalar um quadro de intoxicação ao consumidor, para sua devida identificação. Essa realidade é justificada no fato de que o leite possui, em sua composição, fatores capazes de inibir o PCR. Aslam et al. (2003) sugeriram que a gordura do leite poderia cobrir a superfície bacteriana e dificultar a lise celular, desse modo diminuiria a sensibilidade da reação de PCR. Além disso, tem sido relatado que os componentes dos alimentos, dos meios de cultura e dos reagentes utilizados na extração de DNA podem inibir a reação de PCR ou a enzima *Taq* DNA polimerase, causando decréscimo na sensibilidade da técnica ou até mesmo gerando resultados falso-negativos (Fluit et al., 1993; Manzano et al., 1998; Nogva et al., 2000; Aznar e Alarcón, 2003).

1. **Considerações finais**

Diante dos resultados obtidos, foi possível concluir que a técnica de PCR apresenta limitações quanto a quantificação do gene *tst* de *S. Aureus,* estabelecendo resultados satisfatórios somente se este estiver presente em grandes quantificações. Uma alternativa para essa problemática pode ser o pré-enriquecimento da amostra para o diagnóstico direto do patógeno.

1. **Referências Bibliográficas**

ASLAM, M.; HOGAN, J.; SMITH, K.L. **Development of a PCR-based assay to detect Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella* in milk.** *Food Microbiol.*, v.20, p.345-350, 2003.

AZNAR, R.; ALARCÓN, B**. PCR detection of *Listeria monocytogenes*: a study of multiple factors affecting sensitivity.** *J. Appl. Microbiol.*, v.95, p.958-966, 2003.

BERGDOLL, M.S. **Staphylococcal food poisoning***.* In: CLIVER, D.O. (Ed.). *Foodborne diseases* San Diego: Academic, 1990. p.86-106.

BERGDOLL, M.S**. *Staphylococcus aureus* In: Foodborne bacterial pathogens***.* New York: Marcel Dekker, 1989. p.463-523.

CHESNEY, P.J. **Clinical aspects and spectrum of illness of toxic shock syndrome: overview.** *Rev. Inf. Dis.*, v.11, p.51-57, 1989.

COSTA, Mônica; SANTIAGO, Lopes. Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Microbiologia, **Pesquisa de Staphylococcus Coagulase Positiva Produtor da Toxina 1 da Síndrome do Choque Tóxico (TSST-1) em Amostras de Queijo Minas Artesanal.** [s.l.: s.n.], 2019.

FLUIT, A.C.; TORENSMA, R.; VISSER, M.J.C. et al. **Detection of *Listeria monocytogenes* in cheese with the magnetic immuno-polymerase chain reaction assay.** *Appl. Environ. Microbiol*, v.59, p.1289-1293, 1993.

MANZANO, M.; COCOLIN, L.; CANTONI, C. et al**. A rapid method for the identification and partial serotyping of *Listeria monocytogenes* in food by PCR and restriction enzyme analysis**. *Int. J. Food Microbiol.*, v.42, p.207-212, 1998.

McVey, Scott. **Microbiologia veterinária**/Scott McVey, Melissa Kennedy, M. M. Chengappa ; tradução José Jurandir Fagliari. ­ 3. ed. ­ Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016.

**Microbiologia veterinária e doenças infecciosas** / P. J. Quinn, B. K. ... [et al.]; tradução Lúcia Helena Niederauer Weiss, Rita Denise Niederauer Weiss. – Dados eletrônicos. – Porto Alegre: Artmed, 2007.

NOGVA, H.K.; RUDI, K.; NATERSTAD, K. et al. **Application of 5'-nuclease PCR for quantitative detection of *Listeria monocytogenes* in pure cultures, water, skim milk, and unpasteurized whole milk**. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.66, p.4266-4271, 2000.

PELISSER, M. R.; KLEIN, C. S.; ASCOLI, K. R.; ZOTTI, T. R.; ARISI, A. C. M. **Ocurrence of Staphylococcus aureus and multiplex PCR detection of classic enterotoxin genes in cheese and meat products.** Brazilian Journal of Microbiology, v. 40, n. 1, p. 145-148, 2009.

Ribeiro Junior, J. C., Tamanini, R., Soares, B. F., de Oliveira, A. M., de Godoi Silva, F., da Silva, F. F., Augusto, N. A., & Beloti, V. (2016). **Efficiency of boiling and four other methods for genomic DNA extraction of deteriorating spore-forming bacteria from milk**. Semina: Ciências Agrárias, 37(5), 3069-3078.

RODRÍGUEZ, A.; GORDILLO, R.; ANDRADE, M. J.; CÓRDOBA, J. J.; RODRÍGUEZ, M. **Development of an efficient real-time PCR assay to quantify enterotoxin-producing staphylococci in meat products.** Food Control, v. 60, p. 302-308, 2016.

TEUBER, M. **Microbiologycal problems facing the dairy industry**. *Bull. Int. Dairy Fed.*, n.276, p.6-9, 19.

**VIII. Agradecimentos**

Agradeço às instituições responsáveis pelo subsídio desta pesquisa e de muitas outras, a Fundação de Amparo à Pesquisa do Tocantins (FAPT) e Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para a Cadeia Produtiva do Leite (INCT-Leite), pelo estímulo a ciência e aos estudantes universitários.