



DETECÇÃO DE GENES DO *CLUSTER egc* EM *Staphylococcus aureus* ISOLADOS DE ALIMENTOS DE ORIGEM ANIMAL

ZOCHE, Fernando¹, BASTOS, Caroline Peixoto², BASSANI, Milena Tomasi³; SILVA, Wladimir Padilha⁴

^{1, 2, 3, 4} Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas.

1 - fernandozocche@hotmail.com; 2 - carolpebastos@yahoo.com.br; 3 - silvawp@ufpel.edu.br

1. INTRODUÇÃO

Entre as bactérias do gênero *Staphylococcus*, *S. aureus* é a mais relacionada a casos e a surtos de intoxicação alimentar devido à capacidade de produzir enterotoxinas (EE) (JARRAUD et al., 2001). Embora a maioria dos casos e surtos de intoxicação alimentar estafilocócica seja atribuída às EE clássicas, outras EE, como EEG, EEH e EEI também já foram envolvidas em casos de intoxicação alimentar, indicando que a importância das “novas” EE pode estar sendo subestimada (BLAIOTTA et al., 2004).

Em *S. aureus*, os genes codificadores de EEG (*seg*), EEI (*sei*), EEIM (*selm*), EEIN (*seln*) e EEIO (*selo*) estão agrupados em *clusters* denominados *egc*. (JARRAUD et al., 2001). Supõe-se que a partir de eventos de recombinação genética destes, poderia ser formado um novo gene codificador de um superantígeno estafilocócico capaz de causar intoxicação alimentar. Além disso, a possibilidade de ocorrer transferência horizontal de genes de EE do *cluster egc* entre distintas cepas de *S. aureus* também pode favorecer a evolução da bactéria e determinar o sucesso desse patógeno.

Alimentos preparados com produtos de origem animal são os mais envolvidos em casos e/ou surtos de intoxicação alimentar estafilocócica (RŮŽIČKOVÁ et al., 2008), portanto, a pesquisa de *S. aureus* nesses alimentos e a avaliação de seu potencial em produzir enterotoxinas, são fatores extremamente importantes na investigação epidemiológica dessa doença (LANCETTE e BENNETT, 2001). Assim sendo, o objetivo deste estudo foi detectar, através da PCR, genes pertencentes ao *cluster egc* em *S. aureus* isolados em diferentes alimentos de origem animal e relacionar sua presença com a origem das cepas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O isolamento e a identificação dos isolados de *S. aureus* nos alimentos foram realizados de acordo com LANCETTE e BENNETT (2001). Dos 41 isolados, 14 foram

oriundos de carcaça de frango, 14 de leite cru, 8 de embutidos cárneos e 5 de queijo. As cepas de referência utilizadas foram *S. aureus* FRI361 e *S. aureus* FRI472.

Para detecção dos genes do cluster *egc* foi realizada, primeiramente, a extração do DNA de acordo com protocolo proposto por MATTHEWS et al. (1997). Os oligonucleotídeos utilizados para amplificação dos fragmentos dos genes *seg*, *sei*, *selm*, *seln* e *selo* e para amplificação parcial do cluster *egc* foram os descritos por MCLAUCHLIN et al. (2000) e BLAIOTTA et al. (2004).

Para a amplificação parcial do cluster *egc* utilizou-se um par de oligonucleotídeos (*sei1* e *seg2*) para amplificar um fragmento de 3375 pares de base (pb). Os produtos de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1%, contendo brometo de etídeo, e visualizados sob iluminação ultra-violeta. O marcador de massa molecular utilizado foi o DNA/*Hind*III (Invitrogen®).

Para confirmação da adequada amplificação do fragmento de 3375pb, os produtos de PCR foram purificados por *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (Amersham Biosciences) e digeridos com *Eco*RI e *Hind*III. Após a digestão, os fragmentos foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1 % e comparados com o marcador de massa molecular GeneRuler 1kb DNA Ladder plus (Fermentas®)

A amplificação de fragmentos dos genes *seg*, *sei*, *selm*, *seln* e *selo* foi realizada por PCR uniplex, adaptadas de BLAIOTTA et al. (2004). Os produtos de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1,2%, contendo brometo de etídeo, e visualizados sob iluminação ultra-violeta. O marcador de massa molecular utilizado foi o 100pb DNA Ladder (Invitrogen®).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os oligonucleotídeos iniciadores *sei1* e *seg2* foram específicos para o fragmento de 3375 pb do cluster *egc*, o que foi comprovado pela digestão dos produtos de PCR com *Eco*RI e *Hind*III, obtendo-se fragmentos de 1654pb, 1085pb e 636pb, conforme descrito por JARRAUD et al. (2001) e BLAIOTTA et al. (2004). Da mesma forma, os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação de fragmentos dos genes *seg*, *sei*, *selm*, *seln* e *selo* foram específicos para os respectivos genes. Os fragmentos gerados com as PCR e após a digestão podem ser observados na Figura 1A e 1B.

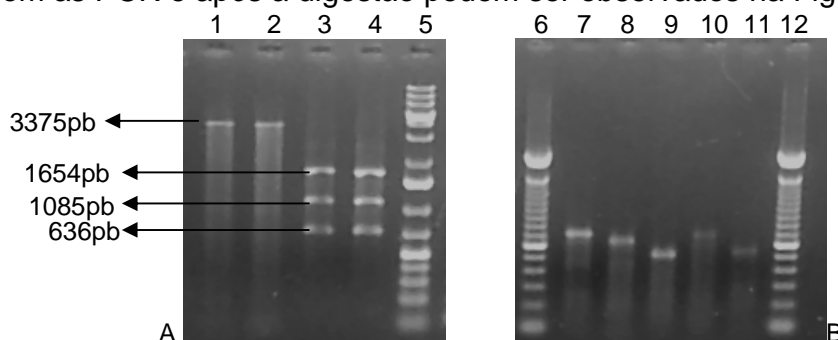


FIGURA 1A: Eletroforese em gel de agarose 1%, de produtos de PCR realizada com DNA de *S. aureus* e oligonucleotídeos iniciadores *sei1* e *seg2*. – Colunas 1 e 2: fragmento do cluster *egc* (3375pb) obtido a partir de DNA de *S. aureus* FRI361 e de DNA de *S. aureus* FRI472, respectivamente; Colunas 3 e 4: Fragmentos do cluster *egc* obtido a partir de DNA de *S. aureus* FRI361 e de DNA de *S. aureus* FRI472, respectivamente, digeridos com *Eco*RI e *Hind*III; Coluna 5: Marcador de massa molecular GeneRuler 1kb DNA Ladder plus (Fermentas®). FIGURA 1B: Eletroforese em gel de agarose 1,2% de produtos de PCR

realizada com DNA de *S. aureus* FRI361 – Colunas 6 e 12: Marcador de massa molecular *Ladder* 100pb (Invitrogen®); Coluna 7: fragmento de *seg* (704pb); Coluna 8: fragmento de *sei* (630pb); Coluna 9: fragmento de *selm* (517pb); Coluna 10: fragmento de *seln* (682pb); Coluna 11: fragmento de *selo* (534pb).

Observou-se que o perfil enterotoxigênico das cepas de *S. aureus* variou de acordo com a sua origem, e houve relação entre a presença de determinados genes de EE e a fonte (alimento de origem animal) de onde a bactéria foi isolada. Os distintos genótipos encontrados nos diferentes alimentos podem ser visualizados na Tabela 1.

Tabela 1: Distribuição e porcentagem dos diferentes genótipos do agrupamento *egc* em *S. aureus* isolados em alimentos de origem animal.

Genótipos	Origem e número de cepas									
	carcaça de frango (n=14)		Embutidos cárneos (n=8)		queijo tipo colônia e minas frescal (n=5)		leite cru (n=14)		Total (n=41)	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
<i>egc</i> ⁽⁻⁾ *	5	35,8	4	50	3	60	14	100	26	63,4
<i>egc</i> ⁽⁺⁾ **	9	64,2	1	12,5	-	-	-	-	10	24,4
<i>seg, selm, seln, selo</i>	-	-	1	12,5	2	40	-	-	3	7,3
<i>seln</i>	-	-	2	25	-	-	-	-	2	4,9

* não portadores de gene pertencente ao agrupamento *egc*; ** portadores de *seg, sei, selm, seln, selo*.

A heterogeneidade genética observada pode ser devido a necessidade da presença de determinados genes, os quais favoreceriam o estabelecimento do microrganismo em um hospedeiro e/ou alimento. Diversos trabalhos corroboram essa hipótese e descrevem um perfil toxigênico distinto e bastante amplo de *S. aureus* encontrado em alimentos de origem animal, como derivados lácteos (BLAIOTTA et al., 2004), embutidos cárneos (BANIA et al., 2006a) e derivados de pescado (SIMON e SANJEEV, 2007), e em diversos animais, como bovinos, caprinos, ovinos, aves, coelhos (SMYTH et al., 2005; VIMERCATI et al., 2006) e suínos (HWANG et al., 2007).

Observa-se que a presença do *cluster egc* completo (genes *seg, sei, selm, seln* e *selo*) foi elevada (64,2%) nas cepas oriundas de carcaça de frango. Essa porcentagem é inferior à relatada por SMYTH et al. (2005), que avaliaram 15 cepas de *S. aureus* oriundas de frango, e encontraram 86,7% das cepas carreando esses genes, porém inferior ao relatado por HWANG et al. (2007), os quais caracterizaram molecularmente 87 cepas de *S. aureus* isoladas desse mesmo alimento e observaram que 36,9% possuíam esse agrupamento completo.

Dez cepas portavam o *cluster egc* completo, entretanto, apenas uma (10%) foi isolada em embutidos cárneos, índice semelhante ao relatado por BANIA et al. (2006a) que, analisando 50 cepas de *S. aureus* isoladas desses alimentos, encontraram 6% com essa característica.

Em trinta e uma cepas não houve amplificação do fragmento de 3375pb, utilizado nesse estudo como marcador do *cluster egc* (*egc* parcial). É digno de nota que embora três dessas cepas (1 proveniente de embutidos cárneos e 2 de queijos), carreassem os genes *seg, selm, seln* e *selo*, e duas (isoladas em embutidos) possuísem apenas o gene *seln*, nenhuma carregava o gene *sei*, o que explica a ausência de amplificação do *egc* parcial.

4. CONCLUSÕES

Há presença de genes do *cluster egc* em *S. aureus* isolados em alimentos de origem animal, entretanto, diferentes genótipos podem ser observados em função da fonte de isolamento. Em *S. aureus* isolados de frangos a presença do *cluster egc* completo é elevada.

5. REFERÊNCIAS

- BANIA, J.; DABROWSKA, A.; BYSTRON, J.; KORZEKWA, K.; CHRZANOWSKA, J.; MOLENDNA, J. Distribution of newly described enterotoxin-like genes in *Staphylococcus aureus* from food. **International Journal of Food Microbiology**, v. 108, p. 36– 41, 2006a.
- BLAIOTTA, G.; ERCOLINI, D.; PENNACCHIA, C.; FUSCO, V.; CASABURI, A.; PEPE, O.; VILLANI, F. PCR detection of staphylococcal enterotoxin genes in *Staphylococcus* spp. strains isolated from meat and dairy products. Evidence for new variants of seG and sel in *S. aureus* AB-8802. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, p. 719-730, 2004.
- HWANG, S. Y.; KIM, S. H.; JANG, E. J.; KWON, N. H.; PARK, Y. K.; KOO, H. C.; JUNG, W. K.; KIM, J. M.; PARK, Y. H. Novel multiplex PCR for the detection of the *Staphylococcus aureus* superantigen and its application to raw meat isolates in Korea. **International Journal of Food Microbiology**, v. 117, p. 99–105, 2007.
- JARRAUD, S.; PEYRAT, M. A.; LIM, A.; TRISTAN, A.; BÈS, M.; MOUGEL, C. ETIENNE, J.; VANDENESCH, F.; BONNEVILLE, M.; LINA, G. *egc*, highly prevalent operon of enterotoxin gene, forms a putative nursery of superantigens in *Staphylococcus aureus*. **The Journal of Immunology**, v.166, p.669-677, 2001.
Nota de correção em: **The Journal of Immunology**, v.166:4260, 2001.
- LANCETTE, G.A.; BENNETT, R.W. *Staphylococcus aureus* and Staphylococcal Enterotoxins. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4.ed. American Public Health Association (APHA), p. 387-400, 2001.
- MATTHEWS, K. R.; ROBERSON, J.; GILLESPIE, B. E.; LUTHER, D. A.; OLIVER, S. P. Identification and differentiation of coagulase-negative *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction. **Journal of Food Protection**, v.60, p.686-688, 1997.
- McLAUHLIN, J.; NARAYANAN, G.L.; MITHANI, V.; O'NEILL, G. The detection of enterotoxins and toxic shock síndrome toxin genes in *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction. **Journal of Food Protection**, v. 63, p.479-488, 2000.
- RŮŽIČKOVÁ, V.; KARPÍŠKOVÁ, R.; PANTŮČEK, R.; POSPÍŠILOVÁ, M.; ČERNÍKOVÁ, P.; DOŠKAŘ, J. Genotype analysis of enterotoxin H-positive *Staphylococcus aureus* strains isolated from food samples in the Czech Republic. **International Journal of Food Microbiology**, v.121, p.60-65, 2008.
- SIMON, S. S.; SANJEEV, S. Prevalence of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in fishery products and fish processing factory workers. **Food Control**, v. 18, p. 1565-1568, 2007.
- SMYTH, D. S.; HARTIGAN, P. J.; MEANEY, W. J.; FITZGERALD, J. R.; DEOBALD, C. F.; BOHACH, G. A.; SMYTH, C. J. Superantigen genes encoded by the *egc* cluster and SaPIbov are predominant among *Staphylococcus aureus* isolated from cows, goats, sheep, rabbits and poultry. **Journal of Medical Microbiology**, v. 54, p. 401-411, 2005.
- VIMERCATI, C.; CREMONESI, P.; CASTIGLIONI, B.; PISONI, G.; BOETTCHER, P. J.; STELLA, A.; VICENZONI, G.; MORONI, P. Molecular Typing of *Staphylococcus aureus*

Isolated from Cows, Goats and Sheep with Intramammary Infections on the Basis of Gene Polymorphisms and Toxins Genes. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 53, p. 423-428, 2006.

6. AGRADECIMENTOS

Ao CNPq, processo 478100/04-3, pelo suporte financeiro.
CAPES.