

**PCR MULTIPLEX PARA DETECÇÃO DE *Staphylococcus aureus*  
ENTEROTOXIGÊNICOS ISOLADOS DE ALIMENTOS DE ORIGEM  
ANIMAL NO SUL DO RIO GRANDE DO SUL, BRASIL**

Fernando Zocche, Rodrigo Correa França, José Antônio Guimarães Aleixo,  
Ângela Nunes Moreira e Wladimir Padilha Da Silva

**RESUMO**

Este trabalho teve como objetivo desenvolver duas PCR multiplex (PCRm) para a detecção dos genes das enterotoxinas estafilocócicas (EE) A (sea), B (seb), C (sec) e D (sed) em *Staphylococcus aureus* isolados de alimentos de origem animal, bem como relacionar a presença desses genes com a origem do microrganismo. As duas PCRm foram padronizadas utilizando-se cepas de *S. aureus* cuja capacidade toxigênica foi previamente confirmada através de ELISA indireto, com o uso de toxinas e soros antitoxinas de referência. Em seis (12%) dos 50 isolados

de *S. aureus* foi possível detectar um ou mais genes de EE, sendo que um isolado albergava os genes sea e seb, três isolados albergavam seb e dois albergavam sed. As duas PCRm desenvolvidas são eficientes para a detecção dos genes sea, seb, sec e sed e, considerando-se a associação existente entre *S. aureus* enterotoxigênicos portadores dos genes sea e seb e humanos, e genes sec e sed com outros animais, a origem mais provável da maioria dos isolados foram os manipuladores de alimentos.

**Introdução**

O gênero *Staphylococcus* é formado por 41 espécies e 24 subespécies (Euzéby, 2008). Entre as bactérias deste gênero, *Staphylococcus aureus* é a mais relacionada a casos

e a surtos de intoxicação alimentar devido à sua capacidade de produzir enterotoxinas (EE) (Chen *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2005). Até o momento, já foram descritas e purificadas dez EE envolvidas com intoxicação alimentar: EEA,

EEB, EEC<sub>1</sub>, EEC<sub>2</sub>, EEC<sub>3</sub>, EED, EEE, EEG, EEH e EEI, as quais, após pré-formadas e ingeridas com o alimento, podem causar sintomas tais como náuseas, vômitos, dores abdominais e diarreia (Jorgensen *et al.*, 2005). *S. aureus*

pode produzir uma ou mais EE simultaneamente (Silva *et al.*, 2005) e, apesar deste patógeno ser produtor de uma grande variedade de EE, 95% dos surtos são causados pelas enterotoxinas A, B, C, D e E (Letertre *et al.*, 2003).

**PALAVRAS CHAVE / Contaminação / Enterotoxigenicidade / Intoxicação Alimentar / Marcadores Genéticos / *Staphylococcus aureus* /**

Recebido: 20/08/2008. Modificado: 18/06/2009. Aceito: 20/06/2009.

**Fernando Zocche.** Médico Veterinário e Doutor em Ciências, Universidade Federal de Pelotas, UFPel, Brasil. Professor, UFPel, Brasil. Endereço: Laboratório de Microbiologia de Alimentos - UFPel. Campus Universitário s/n. Caixa Postal 354, 96010000, Pelotas, RS, Brasil.

e-mail: fernandozocche@hotmail.com

**Rodrigo Correa França.** Médico Veterinário e Bolsista FAPERGS, UFPel, Brasil. e-mail: rodrigodfranca@yahoo.com.br

**José Antônio Guimarães Aleixo.** Médico Veterinário e Doutor em Microbiologia Aplicada, Purdue University (EUA). Professor, UFPel, Brasil. e-mail: biotjaga@ufpel.edu.br

**Ângela Nunes Moreira.** Nutricionista e Doutora em Biotecnologia, UFPel, Brasil. Pro-

fessora, UFPel, Brasil. e-mail: angelnm@ufpel.edu.br

**Wladimir Padilha Da Silva.** Médico Veterinário e Doutor em Ciência dos Alimentos, Universidade de São Paulo. Professor, UFPel, Brasil. e-mail: silvawp@ufpel.edu.br

# MULTIPLEX PCR FOR DETECTION OF ENTEROTOXIGENIC *Staphylococcus aureus* ISOLATED FROM FOOD OF ANIMAL ORIGIN IN SOUTH OF RIO GRANDE DO SUL, BRASIL

Fernando Zocche, Rodrigo Correa França, José Antônio Guimarães Aleixo, Ângela Nunes Moreira and Wladimir Padilha Da Silva

## SUMMARY

The object of this work was to develop two multiplex PCR (mPCR) for the detection of genes of staphylococcal enterotoxins (EE) A (sea), B (seb), C (sec) and D (sed) of *Staphylococcus aureus* isolated from food of animal origin and to relate the presence of the genes with the origin of the microorganism. The two mPCR were standardized using strains of *S. aureus* whose toxigenic capacity was previously confirmed through indirect ELISA, with the use of reference toxins and serum antitoxins. In

six (12%) out of 50 isolates of *S. aureus* it was possible to detect one or more genes of EE; one isolate harbored sea and seb genes, three isolates harbored seb and two harbored sed. The two sets of mPCR developed are efficient for the detection of the sea, seb, sec and sed, and, considering the existing association of enterotoxigenic *S. aureus* genes sea and seb with human beings and genes sec and sed with other animals, the most likely origin of the majority of the isolates are the food handlers.

## PCR MULTIPLEX PARA DETECCÃO DE *Staphylococcus aureus* ENTEROTOXIGÊNICOS AISLADOS DE ALIMENTOS DE ORIGEM ANIMAL EN EL SUR DE RÍO GRANDE DO SUL, BRASIL

Fernando Zocche, Rodrigo Correa França, José Antônio Guimarães Aleixo, Ângela Nunes Moreira y Wladimir Padilha Da Silva

## RESUMEN

Este estudio tuvo como objetivo desarrollar dos PCR multiplex (mPCR) para la detección de los genes de enterotoxinas estafilocócicas (EE) A (sea), B (seb), C (sec) y D (sed) en *Staphylococcus aureus* aislados de alimentos de origen animal, y relacionar la presencia de los genes con el origen del microorganismo. Las mPCR fueron estandarizadas utilizando cepas toxigénicas de *S. aureus*, cuya capacidad fue previamente confirmada por ELISA indirecto, con la utilización de toxinas y sueros de referencia. En seis (12%) de los 50 *S. aureus* aisla-

dos fue posible detectar uno o mas genes de EE, siendo que un aislado albergaba sea y seb, tres aislados albergaban seb y dos albergaban sed. Los dos conjuntos de mPCR desarrollados son eficaces en la detección de los genes sea, seb, sec y sed, y, teniendo en cuenta la asociación entre *S. aureus* enterotoxigénicos con genes sea y seb y humanos, y los genes sec y sed con otros animales, el origen más probable de la mayoría de los aislados son los manipuladores de alimentos.

Leite e derivados lácteos são os alimentos mais envolvidos em casos e/ou surtos de intoxicação alimentar estafilocócica (Cenci-Goga *et al.*, 2003; Fueyo *et al.*, 2005) devido ao fácil acesso de *S. aureus* a matéria-prima, uma vez que este microorganismo é um dos principais agentes de mastite bovina (Zschöck *et al.*, 2005). No entanto, outros alimentos de origem animal podem ser veículos do microorganismo e de suas enterotoxinas (Atanassova *et al.*, 2001; Lancette e Bennett, 2001; Franco e Landgraf, 2002; Jay, 2005).

Nos últimos anos, diversos trabalhos reportaram o uso da amplificação *in vitro* do DNA pela reação em cadeia da polimerase (PCR; *polymerase chain reaction*), para a detecção de patógenos em alimentos (Blaiotta *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2004; Kwon *et al.*, 2004; Gandra, 2006). Para *S. aureus*, a de-

tecção e a genotipagem de genes de EE para serem utilizados como marcadores genéticos, têm sido realizadas através de PCR uniplex, PCR multiplex e, mais recentemente, através de PCR em tempo real (Sharma *et al.*, 2000; Tamarapu *et al.*, 2001; Nájera-Sánchez *et al.*, 2003; Kwon *et al.*, 2004; Chiang *et al.*, 2008).

Essas técnicas são rápidas, específicas, sensíveis e confiáveis quando comparadas às metodologias tradicionalmente utilizadas para a diferenciação e identificação deste microorganismo. Entre essas, destaca-se PCR multiplex (PCRm), que é uma variação da PCR, a qual utiliza dois ou mais pares de *primers* na mesma reação, permitindo a detecção de mais de um gene simultaneamente. Considerando o potencial da

TABELA I  
CEPAS DE ESTAFILOCOCOS UTILIZADAS NA PADRONIZAÇÃO DAS PCRM E RESPECTIVAS ENTEROTOXINAS PRODUZIDAS

Cepa padrão	Enterotoxina
<i>Staphylococcus aureus</i> FRI 100	A
<i>Staphylococcus aureus</i> FRI S6	A e B
<i>Staphylococcus aureus</i> FRI 361	C e D
<i>Staphylococcus aureus</i> FRI 472	D
<i>Staphylococcus aureus</i> 4752	B
<i>Staphylococcus warneri</i>	-

FRI: Food Research Institute.

PCRm como meio de diagnóstico para identificação de *S. aureus*, além da importância de se determinar o tipo de EE como fator relevante na avaliação epidemiológica de casos e surtos de intoxicação estafilocócica, objetivou-se desenvolver duas PCRm para a detecção dos genes codificadores de EEA, EEB, EEC e EED em *S. aureus* isolados de leite *in natura* e de outros alimentos de origem animal,

bem como relacionar a presença dos genes com a origem desses microorganismos.

## Material e Métodos

*Cepas e isolados bacterianos*

Para a padronização da PCRm foram utilizadas quatro cepas de *Staphylococcus aureus* enterotoxigênicos (*S. aureus* FRI100, *S. aureus* FRIS6, *S. aureus* FRI361, *S. aureus* FRI472), uma cepa enterotoxigênica (*S. aureus* 4752) isolada no campo e uma cepa de *Staphylococcus warneri*, não produtora de enterotoxinas, como controle negativo. As culturas bacterianas utilizadas e o tipo de enterotoxina produzida podem ser visualizados na Tabela I.

Após a padronização, 50 isolados de *S. aureus* foram avaliados quanto a presen-

ça dos genes de EEA, EEB, EEC e EED, sendo 30 deles oriundos de leite *in natura* e 20 de diversos produtos de origem animal: queijo (n= 1), charque (n= 2), embutidos cárneos (n= 8) e carcaça de frango (n= 9). Os isolados foram identificados através de sementeira em ágar Baird-Parker (Acumedia®), ágar Baird-Parker suplementado com acriflavina (7µg·ml<sup>-1</sup>; Sigma®), coloração de Gram, produção de coagulase em plasma de coelho, catalase e β-galactosidase (Sigma®), conforme descrito por Gandra (2003) e Lancette e Benett (2001).

#### Extração de DNA

A extração de DNA genômico dos isolados de *S. aureus* foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Matthews *et al.* (1997), com modificações. Inicialmente, transferiu-se uma alçada de uma cultura de *S. aureus* em ágar tripticase de Soja (TSA; Acumedia®) incubado a 37°C por 24h para 100µl de tampão Tris-EDTA (10mM Tris base e 5mM EDTA, pH 7,8) de forma a obter a turbidez 1,0 da escala de MacFarland. A lise do peptidoglicano celular ocorreu pela adição de 100µl de lisostafina (100µg·ml<sup>-1</sup>; Sigma®) e incubação a 37°C em banho-maria por 45min. Para completar a lise celular, adicionou-se 20µl de tampão Tris-EDTA (50mM Tris base e 20mM de EDTA, pH 7,8) contendo 20% de dodecil sulfato de sódio (SDS; Pharmacia®) e 3µl de proteinase K (20mg·ml<sup>-1</sup>; Invitrogen®), e incubou-se em banho-maria a 37°C por 1h. A seguir, adicionou-se 200µl de solução NaCl 5M e agitou-se manualmente por 15sec. Separou-se o material intracelular através de centrifugação a 10.000 x g por 15 minutos a 4°C e transferiu-

TABELA II  
PRIMERS UTILIZADOS NA DETECÇÃO DE *S. aureus* ENTEROTOXIGÊNICOS E RESPECTIVOS PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO

Primers	Seqüência 5' → 3'	Posição no gene	Produto de amplificação (pb)	Referência
ESA1	ACGATCAATTTTACAGC	203 a 222	544	Rosec e Gigaud (2002)
ESA2	TGCATGTTTCAGAGTTAATC	726 a 746		
ESB1	GAATGATATTAATTCGCATC	621 a 640	416	Rosec e Gigaud (2002)
ESB2	TCTTTGTCGTAAGATAAACTTC	1015 a 1036		
SEC1	GACATAAAAGCTAGGAATTT	676 a 695	257	Nájera-Sánchez <i>et al.</i> (2003)
SEC2	AAATCGGATTAACATTATCCA	912 a 932		
SED1	CAAATATATTGATATAATGA	4 a 23	330	Este estudo
SED2	AGTAAAAAAGAGTAATGCAA	314 a 333		
femA1	AAAAAAGCACATAACAAGCG	1444 a 1463	132	Mehrotra <i>et al.</i> (2000)
femA2	GATAAAGAAGAAACCAGCAG	1556 a 1575		

pb: pares de base.

se o sobrenadante para um novo microtubo. Adicionou-se fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1) para a liberação e separação de proteínas e, após centrifugação a 10000g por 15min, transferiu-se o sobrenadante para um novo microtubo. A precipitação do DNA foi realizada com 800µl de álcool etílico absoluto gelado, e manutenção em -20°C por, no mínimo, 2h. Após, foi realizada nova centrifugação a 10000g por 15min a 4°C, ressuspendendo-se o *pellet* com 30µl de água ultrapura estéril. A qualidade e a quantidade de DNA extraído foram estimadas por eletroforese em gel de agarose 1% e comparação com o padrão de massa molecular DNAλ/HindIII (Invitrogen®).

#### Primers e PCR multiplex

Foram utilizadas duas PCRM com os *primers* descritos na Tabela II. Na primeira PCRM utilizou-se 250mM de cada um dos *primers* ESA1 e 2, ESB1 e 2, femA1 e femA2, solução tampão para PCR, 5mM de cloreto de magnésio, 218µM de dNTPs mix, 1,5U de *Taq* DNA polimerase e 1µl do DNA alvo (10-20ng·µl<sup>-1</sup>) em 40µl de volume final. Na segunda, utilizaram-se os mesmos constituintes, exceto pelos *primers*, os quais foram SEC1 e 2, SED1 e 2, femA1 e femA2 (250mM). Em todas as PCRM foram utilizados os *primers* femA1 e femA2 para a amplificação do gene *femA*,

um gene que codifica uma proteína envolvida na resistência de *S. aureus* à metilicina, que está presente universalmente nesse microrganismo. Assim, a utilização destes *primers* conferiu um controle interno de amplificação (IAC) não competitivo à reação (Hoorfar *et al.*, 2004), o que minimiza a possibilidade de resultados falso negativos.

A amplificação dos fragmentos alvo foi realizada em termociclador (MJ Research, PTC-100, Peltier Thermal Cycler), através de desnaturação inicial do DNA à 95°C por 5min, seguido de 37 ciclos (95°C - 1min; 44,5°C - 1min e 72°C - 1min), e de extensão final à 72°C por 10min. Os produtos de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 2% contendo brometo de etídeo, e visualizados sob iluminação ultra-violeta. O marcador de massa molecular utilizado foi o 100pb DNA Ladder (Invitrogen®).

#### ELISA indireto

Antes da padronização das PCRM, as enterotoxinas estafilocócicas A, B, C e D produzidas pelas cepas padrão de *S. aureus* utilizadas (Tabela I) foram detectadas e quantificadas através do método *indirect enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA indireto). Utilizou-se enterotoxinas puras e soros padrão antitoxinas (FUNED-MG) preparados em coelho, um conjugado composto de anticorpo de suíno anti-

imunoglobulina de coelho ligado a peroxidase (Dako A/S®) e uma solução bloqueadora a base de fluido ascítico produzido em camundongo por hibridoma secretor de IgG2b. Para a padronização do ELISA indireto, diferentes concentrações das EE purificadas, diluídas em sobrenadante de um cultivo de *S. warneri* em caldo *brain hearth in-*

*fusion* (BHI; Acumedia®) dupla concentração e adicionado de 1% de extrato de levedura, foram utilizadas para sensibilizar cavidades de placas de ELISA por 1h a 37°C. Após a sensibilização, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS (tampão fosfato salino, pH 7,4) contendo 0,05% de Tween 20 (PBST) e as cavidades bloqueadas por 1h a 37°C com fluido ascítico diluído 1:20 em PBST. Repetiu-se a lavagem, adicionaram-se diferentes concentrações dos soros antitoxina diluídos em PBST, e incubou-se 1 hora a 37°C. Nova lavagem foi feita e o conjugado diluído 1:1000 em PBST foi adicionado. Após incubação por 1h a 37°C as placas foram lavadas 5 vezes e o substrato cromógeno foi adicionado, deixando-se reagir por 15min. Ao final da reação, a absorbância foi lida em um leitor de placas (Multiskan MCC/340; Titertek®) a 450nm.

#### Resultados e Discussão

A avaliação da capacidade toxigênica das cepas padrão através de ELISA indireto confirmou a expressão dos genes de interesse (Tabela III).

Duas PCRM foram padronizadas para a detecção dos genes das EE clássicas (A, B, C e D) de *S. aureus*, bem como de um gene utilizado como controle interno de amplificação (gene *femA*). Os fragmentos dos genes *sea*, *seb* e *femA* foram amplificados através da

primeira PCRm descrita neste estudo, e os fragmentos dos genes *sec*, *sed* e *femA*, através da segunda. Exemplos de produtos das ampliações destes genes podem ser observados na Figura 1.

Sharma *et al.* (2000) e Kwon *et al.* (2004) descrevem que, quando vários pares de primers são utilizados simultaneamente, um ou mais fragmentos de genes podem não ser amplificados, ou podem ocorrer ampliações inespecíficas dificultando a interpretação dos resultados, o que não foi observado neste estudo, uma vez que nas duas PCRm desenvolvidas, todos os genes alvo foram amplificados sem a ocorrência de ampliações inespecíficas.

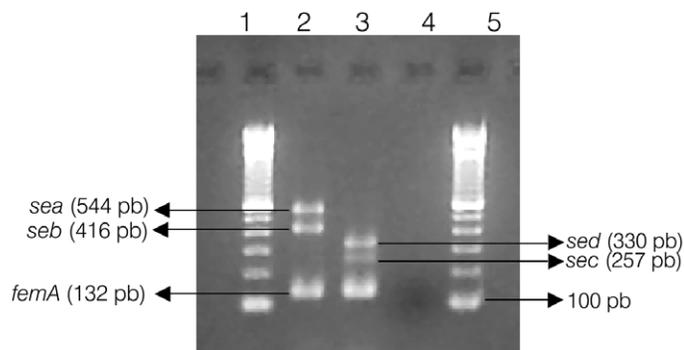


Figura 1. Produtos de PCRm visualizados em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídeo. Pistas 1 e 5: marcador de massa molecular 100 pb Ladder. Pista 2: ampliações obtidas com os primers ESA1 e 2, ESB1 e 2, femA1 e 2 e DNA de *S. aureus* FRI S6; Pista 3: ampliações obtidas com os primers SEC1 e 2, SED1 e 2, femA1 e 2 e DNA de *S. aureus* FRI 361; Pista 4: controle negativo.

Após a calibração das PCRm, 50 *S. aureus* isolados de distintos alimentos de origem animal foram avaliados quanto à presença de genes das EE clássicas, verificando-se que apenas seis (12%) albergavam um ou mais desses genes, como pode ser observado na Tabela IV. Destaca-se que o gene *femA*, utilizado como controle interno de amplificação (IAC), foi amplificado em 100% dos isolados.

A toxigenicidade de *S. aureus* é muito variável entre cepas e vários estudos epidemiológicos foram conduzidos

TABELA III  
DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE ENTEROTOXINAS ESTAFILOCÓCICAS (EE) EM SOBRENADANTE DE CULTIVO DE CEPAS PADRÃO DE *S. aureus* ATRAVÉS DE ELISA INDIRETO E DETECÇÃO DE GENES DE EE ATRAVÉS DE PCRm

Cepas padrão	EE pesquisada em sobrenadante <sup>(2)</sup>	Concentração celular (UFC.ml <sup>-1</sup> )	EE produzida (ng.ml <sup>-1</sup> )	PCRm			
				EEA	EEB	EEC	EED
<i>S. aureus</i> FRI 100	A	2,0×10 <sup>8</sup>	82,27	+	-	nr	nr
<i>S. aureus</i> FRI S6	B	1,7×10 <sup>10</sup>	7,55	+	+	nr	nr
<i>S. aureus</i> FRI 361 <sup>(1)</sup>	C	3,8×10 <sup>9</sup>	9,73	nr	nr	+	+
<i>S. aureus</i> FRI 361 <sup>(1)</sup>	D	2,4×10 <sup>10</sup>	134,00	nr	nr	+	+
<i>S. aureus</i> FRI 472	D	9,7×10 <sup>8</sup>	19,59	nr	nr	-	+
<i>S. aureus</i> 4752	B	7,3×10 <sup>9</sup>	4,9	-	+	nr	nr

FRI: Food Research Institute, nr: não realizado.

<sup>(1)</sup> Cultivos realizados em dias diferentes.

<sup>(2)</sup> Obtidos após cultivo da cepa em caldo BHI, dupla concentração, adicionado de 1% de extrato de levedura, por 24h à 37°C.

para avaliar o percentual de cepas enterotoxigênicas em distintas fontes. Diversas hipóteses têm sido propostas para esclarecer essa variação, entre elas, a origem dos isolados (Chen *et al.*, 2004).

dos isolados de *S. aureus* enterotoxigênicos em amostras obtidas a partir dessa mesma fonte. Outro estudo (Santana *et al.*, 2006) também realizado no Rio Grande do Sul, Brasil, demonstrou baixa prevalência de *S. aureus* enterotoxigênicos em leite cru, ao contrário do evidenciado em outras regiões brasileiras, como por exemplo, em Pernambuco, onde Stamford *et al.* (2006) encontraram 77% de *S. aureus* enterotoxigênicos em leite *in natura*. Com relação ao isolamento em carcaças de frango, neste estudo observou-se que das 9 cepas de *S. aureus* analisadas, 4 apresentaram genes de EE (44,4%), um índice considerado elevado quando comparado ao descrito por outros autores. Hwang *et al.* (2007), analisando 87 *S. aureus* isolados de carne de frango, encontraram 5,7% de cepas albergando o gene *sea*, e nenhuma portando os genes das outras EE clássicas. Já Kwon *et al.* (2004)

Neste estudo, a prevalência de *S. aureus* portadores dos genes codificadores de EEA, EEB e EED, foi baixa (12%), não tendo sido isolado *S. aureus* portador do gene *sec*. Na Dinamarca, Aarestrup *et al.* (1995), avaliaram 160 *S. aureus* provenientes de leite *in natura*, e não encontraram isolados toxigênicos, resultado semelhante ao deste estudo, onde não foram detecta-

TABELA IV  
PRESENÇA DE GENES DAS ENTEROTOXINAS ESTAFILOCÓCICAS A, B, C E D EM ISOLADOS DE *S. aureus*

Fonte de isolamento	PCRm para detecção do gene <sup>(1)</sup>				
	<i>sea</i>	<i>seb</i>	<i>sec</i>	<i>sed</i>	<i>femA</i>
Lingüiça suína	-	+	-	-	+
Lingüiça suína	+	+	-	-	+
Carcaça de frango	-	+	-	-	+
Carcaça de frango	-	+	-	-	+
Carcaça de frango	-	-	-	+	+
Carcaça de frango	-	-	-	+	+

<sup>(1)</sup> Reação positiva (+) indicada através de amplificação específica do fragmento do gene.

e Smyth *et al.* (2005), após avaliarem 39 e 15 *S. aureus* isolados de frangos, respectivamente, não detectaram cepas toxigênicas portadoras dos genes de EE clássicas.

É interessante ressaltar que através das PCRm desenvolvidas foi possível demonstrar que embora a prevalência de *S. aureus* portadores dos genes das EE clássicas seja baixa em alimentos de origem animal, na região avaliada, há ocorrência de distintos genótipos enterotoxigênicos desse microrganismo, e que há relação entre esses genótipos e a fonte de isolamento do microrganismo, o que é uma informação importante do ponto de vista epidemiológico.

Diversos estudos têm demonstrado que há relação entre a fonte de isolamento e o tipo de EE produzida por *S. aureus*. EEA e EEB são associadas com contaminação de origem humana (Adesiyun *et al.*, 1998; Fueyo *et al.*, 2005), enquanto EEC e EED, com contaminação proveniente de animais bovinos e suínos, respectivamente (Tollersrud *et al.*, 2000; Stephan *et al.*, 2001; Nájera-Sánchez *et al.*, 2003; Jorgensen *et al.*, 2005). Essa informação permite inferir a provável fonte de contaminação de um determinado alimento. Neste estudo, por exemplo, observou-se que o gene *sed* não foi detectado nos isolados provenientes de produtos de origem suína (lingüiça), entretanto, os genes *sea* e *seb* foram encontrados nesse tipo de produto (Tabela IV), sugerindo contaminação cruzada através de seres humanos, o que pode ser explicado pelo alto grau de manipulação sofrido por esses alimentos. O mesmo pode ser verificado quando se avaliam os isola-

dos provenientes das carcaças de frango, nos quais apenas os genes *seb* e *sed* foram detectados.

Outra informação relevante confirmada neste estudo foi que um isolado de *S. aureus* pode albergar mais de um gene de EE. Observou-se que o isolado proveniente de lingüiça suína portava os genes *sea* e *seb* (Tabela IV), resultado semelhante ao relatado por Sharma *et al.* (2000), Nájera-Sánchez *et al.* (2003) e por Silva *et al.* (2005), que também utilizaram PCRm com esse objetivo. A presença de mais de um gene de EE em uma mesma cepa apresenta relevância epidemiológica, tendo em vista a possibilidade de haver produção simultânea das duas enterotoxinas, conforme já descrito por Silva *et al.* (2005), o que potencializa sua capacidade toxigênica, pois uma vez presente no alimento, pode ocorrer a expressão dos dois genes simultaneamente, com possível envolvimento de ambas toxinas em casos e/ou surtos de intoxicação alimentar.

## Conclusões

As PCRm desenvolvidas são eficientes na detecção dos genes de EEA, EEB, EEC e EED de *Staphylococcus aureus* e permitiram verificar que a prevalência de *S. aureus* portadores dos genes *sea*, *seb*, *sec* e *sed* é baixa em alimentos de origem animal, na região sul do Rio Grande do Sul, Brasil e que a origem mais provável dos isolados de *S. aureus* nas amostras avaliadas são os manipuladores de alimentos.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, processo 478100/04-3, pelo suporte financeiro; à Fundação Ezequiel Dias (FUNED-MG) pelo fornecimento de enterotoxinas estafilocócicas purificadas e soros padrão antitoxinas; à CAPES e à FAPERGS, pela concessão de bolsa de doutorado e de iniciação científica.

## REFERÊNCIAS

- Aarestrup FM, Andersen JK, Jensen NE (1995) Lack of staphylococcal enterotoxin production among isolates of *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis in Denmark. *Acta Vet. Scand.* 36: 273-275.
- Adesiyun AA, Webb LA, Romain HT (1998) Prevalence and characteristics of *Staphylococcus aureus* from bulk and composite milk and cattle handlers. *J. Food Protect.* 61: 629-632.
- Atanassova V, Meindl A, Ring C (2001) Prevalence of *Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxins in raw pork and uncooked smoked ham - a comparison of classical culturing detection and RFLP-PCR. *Int. J. Food Microbiol.* 68: 105-113.
- Blaiotta G, Ercolini D, Pennacchia C, Fusco V, Casaburi A, Pepe O, Villani F (2004) 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. *J. Appl. Microbiol.* 97: 719-730.
- Cenci-Goga BT, Karama M, Ros-sitto PV, Morgante RA, Cullor JS (2003) Enterotoxin production by *Staphylococcus aureus* isolated from mastitic cows. *J. Food Protect.* 66: 1693-1696.
- Chen TR, Chiou CS, Tsen HY (2004) Use of novel PCR primers specific to the genes of staphylococcal enterotoxin G, H, I for the survey of *Staphylococcus aureus* strains isolated from food-poisoning cases and food samples in Taiwan. *Int. J. Food Microbiol.* 92: 189-197.
- Chiang YC, Liao WW, Fan CM, Pai WY, Chiou CS, Tsen HY (2008) PCR detection of staphylococcal enterotoxins (SEs) N, O, P, Q, R, U, and survey of SE types in *Staphylococcus aureus* isolates from food-poisoning cases in Taiwan. *Int. J. Food Microbiol.* 121: 66-73.
- Euzéby JP (2008) List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature. [www.bacterio.cict.fr/s/staphylococcus.html](http://www.bacterio.cict.fr/s/staphylococcus.html) (Cons. 23/03/2008).
- Franco BDGM, Landgraf M (2002) *Microbiologia dos Alimentos*. 2ª ed. Atheneu. São Paulo, Brasil. 184 pp.
- Fueyo JM, Mendoza MC, Martín MC (2005) Enterotoxins and toxic shock syndrome toxin in *Staphylococcus aureus* recovered from human nasal carriers and manually handled foods: epidemiological and genetic findings. *Microb. Infect.* 7: 187-194.
- Gandra EA (2003) *Identificação de Staphylococcus aureus*, *S. intermedius* e *S. hyicus* Através de Testes Bioquímicos e da Amplificação por PCR de Sequências dos Genes *coa* e *nuc*. Tese. Universidade Federal de Pelotas. Brasil. 100 pp.
- Gandra EA (2006) *Multiplex PCR para Detecção de S. aureus, S. intermedius e S. hyicus em Leite UHT Artificialmente Contaminado*. Tese. Universidade Federal de Pelotas, Brasil. 69 pp.
- Hoorfar J, Malorny B, Abdulmawjood A, Cook N, Wagner M, Fach P (2004) Practical considerations in design of internal amplification controls for diagnostic PCR assays. *J. Clin. Microbiol.* 42: 1863-1868.
- Hwang SY, Kim SH, Jang EJ, Kwon NH, Park YK, Koo HC, Jung WK, Kim JM, Park YH (2007) Novel multiplex PCR for the detection of the *Staphylococcus aureus* superantigen and its application to raw meat isolates in Korea. *Int. J. Food Microbiol.* 117: 99-105.
- Jay JM (2005) Gastroenterite estafilocócica. Em *Microbiologia de Alimentos*. Trad. Tondo EC *et al.* Artmed. Porto Alegre, Brasil. pp. 471-489.
- Jorgensen HJ, Mork T, Hogasen HR, Horvik LM (2005) Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in bulk milk in Norway. *J. Appl. Microbiol.* 97: 158-166.
- Kwon NH, Kim SH, Park KT, Bae WK, Kim JY, Lim JY, Ahn JS, Lyoo KS, Kim JM, Jung WK, Noh KM, Bohach GA, Park YH (2004) Application of extended single-reaction multiplex polymerase chain reaction for toxin typing of *Staphylococcus aureus* isolates in South Korea. *Int. J. Food Microbiol.* 97: 137-145.
- Lancette GA, Bennett RW (2001) *Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxins. Em *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. 4ª ed. American Public Health Association (APHA). Washington, DC, EEUU. pp. 387-400.
- Letertre C, Perelle S, Dilasser F, Fach P (2003) Detection and genotyping by real-time PCR of the staphylococcal enterotoxin genes *sea* to *sej*. *Mol. Cell. Probes* 17: 139-147.
- Matthews KR, Roberson J, Gillespie BE, Luther DA, Oliver SP (1997) Identification and differentiation of coagulase-negative *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction. *J. Food Protect.* 60: 686-688.
- Mehrotra M, Wang G, Johnson WM (2000) Multiplex PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1, and Methicillin resistance. *J. Clin. Microbiol.* 38: 1032-1035.
- Nájera-Sánchez G, Maldonado-Rodríguez R, Olvera PR, Garza LM (2003) Development of two multiplex polymerase chain reactions for the detection of enterotoxigenic strains of *Staphylococcus aureus* isolated from foods. *J. Food Protect.* 66: 1055-1062.
- Rosec JP, Gigaud O (2002) Staphylococcal enterotoxin genes of classical and new types detected by PCR in France. *Int. J. Food Microbiol.* 77: 61-70.
- Santana EHW, Beloti V, Oliveira TCRM, Moraes LB, Tamanini R, Silva WP (2006) Estafilococos: morfologia das colônias, produção de coagulase e enterotoxina a, em amostras isoladas de leite cru refrigerado. *Semina. Ciênc. Agr.* 27: 639-646.
- Sharma NK, Rees CED, Dodd CER (2000) Development of a single-reaction multiplex PCR toxin typing assay for *Staphylococcus aureus* strains. *Appl. Env. Microbiol.* 66: 1347-1353.
- Silva ER, Carmo LS, Silva N (2005) Detection of the enterotoxins A, B and C genes in *Staphylococcus aureus* from goat and bovine mastitis in Brazilian dairy herds. *Vet. Microbiol.* 106: 103-107.
- Smyth DS, Hartigan PJ, Meaney WJ, Fitzgerald JR, Deobald CF, Bohach GA, Smyth CJ (2005) Superantigen genes encoded by the *egc* cluster and SaPIbov are predominant among *Staphylococcus aureus* isolated from cows, goats, sheep, rabbits and poultry. *J. Med. Microbiol.* 54: 401-411.
- Stamford TLM, Silva CGM, Mota RA, Cunha Neto A (2006) Enterotoxigenidade de *Staphylococcus* spp. isolados de leite in natura. *Ciênc. Tecnol. Alim.* 26: 41-45.
- Stephan R, Annemüller C, Hassan AA, Lämmler Ch (2001) Characterization of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis in north-east Switzerland. *Vet. Microbiol.* 78: 373-382.
- Tamarapu S, Mckillip JL, Drake M (2001) Development of a multiplex polymerase chain reaction assay for detection and differentiation of *Staphylococcus aureus* in dairy products. *J. Food Protect.* 64: 664-668.
- Tollersrud T, Kenny K, Caugant DA, Lund A (2000) Characterization of isolates of *Staphylococcus aureus* from acute, chronic and subclinical mastitis in cows in Norway. *Acta Pathol. Microbiol. Immunol.* 108: 565-572.
- Zschöck M, Bärbel K, Wolter W, Hamman HP, Lämmler C (2005) Pattern of enterotoxin genes *seg*, *seh*, *sei* and *sej* positive *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. *Vet. Microbiol.* 108: 243-249.