

DETECÇÃO DO GENE DA ENTEROTOXINA E (*entE*) EM CEPAS DE *Staphylococcus aureus* ISOLADAS DE CARÇAÇAS DE FRANGO

BASSANI, Milena Tomasi¹; BASTOS, Caroline Peixoto²; SILVA, Wladimir Padilha³

^{1,2,3} Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas.
1-mtbassani@yahoo.com.br – 3- silvawp@ufpel.edu.br

1. INTRODUÇÃO

Staphylococcus aureus é a espécie mais relacionada a casos e a surtos de intoxicação alimentar devido à capacidade de produzir enterotoxinas (EE) (JARRAUD et al., 2001). Dentre as EE, as nomeadas clássicas, que correspondem as EEA, EEB, EEC, EED e EEE, são as mais envolvidas em surtos e casos de intoxicação alimentar estafilocócica (BALABAN E RASSOLY, 2000). Al-Tarazi et al. (2009), reportam que as enterotoxinas clássicas (EEA – EEE) são responsáveis por 95% dos casos de intoxicação alimentar estafilocócica, e que o restante é causado pelas denominadas novas enterotoxinas.

Os sintomas da intoxicação alimentar estafilocócica surgem dentro de uma a seis horas após a ingestão do alimento contaminado, e incluem: diarreia, dor abdominal e, tipicamente, vômito. A doença é autolimitante, com sintomas durando em média 24 a 48 horas, o que muitas vezes torna os índices de hospitalização e notificação baixos (SILVA, 1998; JORGENSEN et al., 2005;)

Alimentos como 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).

2. MATÉRIAS E MÉTODOS

A identificação dos 38 isolados de *S. aureus* oriundos de carcaças de frango foram realizadas de acordo com LANCETTE e BENNETT (2001). A cepa de referência utilizada foi *S. aureus* FRI326.

Para detecção do gene da enterotoxina E (*entE*) foi realizada, primeiramente, a extração do DNA de acordo com protocolo proposto por MATTHEWS et al. (1997). Os oligonucleotídeos utilizados para amplificação do fragmento do gene *ente*, de 482 pares de base (pb), foi o descrito por JARRAUD et al. (2002). Como controle positivo de reação foi utilizado fragmento do gene *femA* de 136pb, descrito por ZOOCHÉ (2009).

A amplificação de fragmento do gene *entE* e *femA*, foi realizada por PCR uniplex, adaptada de JARRAUD et al. (2002). Os produtos de PCR foram submetidos à 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

Nenhum dos isolados de carcaça de frango testados carregavam o gene da enterotoxina E, mas os oligonucleotídeos iniciadores para os genes *entE* e *femA* se mostraram específicos. Na figura 1 podemos observar o fragmento esperado de 482 pb para *entE* e de 136 pb para o gene *femA* na cepa padrão *S. aureus* FRI 326.

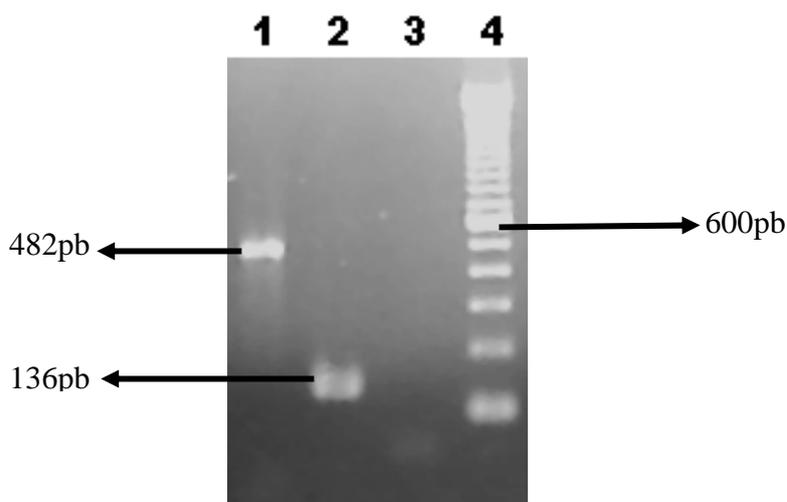


FIGURA 1: Eletroforese em gel de agarose 1,2%, de produtos de PCR realizada com DNA de *S. aureus* e oligonucleotídeos iniciadores. – Colunas 1: fragmento do gene *entE* (482pb) obtido de DNA de *S. aureus* FRI 326; Coluna 2: controle positivo da reação, fragmento do gene *femA* (136pb) obtido de DNA de *S. aureus* FRI 326; Coluna 3: controle negativo da reação; Coluna 4: Marcador de massa molecular DNA *Ladder* 100pb (Invitrogen®).

Resultados similares foram encontrados por Al-Tarazi et al. (2009), que pesquisando os genes das enterotoxinas clássicas em 231 isolados de carne de diversas origens, não encontram nenhum isolado carreador do gene da enterotoxina E, demonstrando a baixa incidência desse gene entre isolados oriundos de carne.

Rossec et al. (1997), explicam que a baixa incidência de enterotoxigenicidade encontrada em estudos envolvendo alimentos é comum, visto que, maioria das cepas enterotoxigênicas são isoladas de manipuladores, o que ressalta o cuidado com os BPF (boas práticas de fabricação) na indústria.

Avaliando isolados de embutidos cárneos no Brasil, Pelisser et al. (2009) encontraram 3 isolados positivos para *eea* e *eee*, resultados diferentes dos encontrados neste estudo. Relacionando os dados, reportamos uma possível relação entre a presença de genes das toxinas e origem genética, concluindo que a patogenicidade específica da bactéria é associada a um clone específico ou a grupos clonais.

Em Portugal, Perreira et al. (2009) estudaram o perfil enterotoxigênico de diversos alimentos, e encontram em 49% (148 cepas) dos isolados algum gene para enterotoxinas clássicas ou nova, mas ao avaliarem os genes individualmente, nenhum isolado carregava o gene *entE*. Esses resultados corroboram com os

encontrados neste estudo, o que demonstra, mais uma vez, a baixa incidência de isolamento da enterotoxina E.

4. CONCLUSÃO

Assim concluímos que os isolados de carcaça de frango oriundo da região sul do Rio Grande do Sul apresentam baixa incidência para o gene da enterotoxina E.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL-TARAZI, YASSER; ALBETAR, MOHAMAD; ALABOUDI, AKRAM. Biotyping and enterotoxigenicity of *Staphylococci* isolated from fresh and frozen meat marketed in Jordan. **Food Research International**, v. 42, p. 374-379, 2209.
- BALABAN, N.; RASOOLY, A. Staphylococcal enterotoxins. **International Journal of Food Microbiology**, v.61, p.1-10. 2000.
- JARRAUD, S.; MOUGEL, C.; THIOULOUSE, J.; LINA, G.; MEUGNIER, H.; FOREY, F.; NESME, X.; ETIENNE, J.; VANDENESCH, J. Relationships between *Staphylococcus aureus* Genetic Background Virulence Factors, agr Groups (Alleles), and Human Disease. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 2, p. 631-641, 2002.
- 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.
- JORGENSEN, H. J.; MATHISEN, T.; LOVSETH, A.; OMOE, K.; QVALE, K. S.; LONCAREVIC, S. An outbreak of staphylococcal food poisoning caused by enterotoxin H in mashed potato made with raw milk. **FEMS Microbiology Letters**, v.252, p. 267–272, 2005.
- 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.
- PELISSER, M. R.; KLEIN, C. S.; ASCOLI, K. R.; THAÍS REGINA ZOTTI, T. R.; ARISI, A. C. M. Ocurrência de *Staphylococcus aureus* and multiplex PCR detection of classic enterotoxin genes in cheese and meat products. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, p.: 145-148, 2009.
- PEREIRA, V.; LOPES, C.; CASTRO, A.; SILVA, J; GIBBS,P.; TEIXEIRA, P. Characterization for enterotoxin production, virulence factors, and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from various foods in Portugal. **Food Microbiology**, p. 1–5, 2009.
- ROSEC, J., GUIRAUD, J., DALET, C., & RICHARD, N. Enterotoxin production by *Staphylococci* isolated from foods in France. **International Journal Food Microbiology**, 35, 213–221, 1997.

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.

SILVA, W. P. Caracterização fenotípica e genotípica de cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas de leite de vacas com mastite subclínica e de outras fontes em propriedades produtoras de leite. 1998. **Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos)** - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

ZOCHE, F.; FRANÇA, RODRIGO CORREA, ALEIXO, JOSÉ ANTÔNIO GUIMARÃES; MOREIRA, A. N.; SILVA, WLADIMIR PADILHA DA. PCR MULTIPLEX Para detecção de *Staphylococcus aureus* enterotoxigênicos isolados de alimentos de origem animal no sul do rio grande do sul, brasil. **Interciência (Caracas)**, v. 34, p. 487-491, 2009.

6. AGRADECIMENTOS

Ao CNPq e a CAPES pelo suporte financeiro ao projeto.