

Detecção de genes do *egc* cluster em *Staphylococcus aureus* isolados de alimentos de origem animal

Detection of genes of *egc* cluster in *Staphylococcus aureus* isolated from foods of animal origin

Fernando Zocche^I Caroline Peixoto Bastos^{II} Wladimir Padilha da Silva^{II}

RESUMO

Os objetivos deste estudo foram detectar, por PCR, genes codificadores de enterotoxinas estafilocócicas, pertencentes ao cluster *egc* (genes *seg*, *sei*, *selm*, *seln* e *selo*) em *Staphylococcus aureus* isolados em diferentes alimentos de origem animal, e relacionar sua presença com a fonte de isolamento. Quarenta e uma cepas de *S. aureus* de diferentes origens (carne de frango, leite cru, embutidos cárneos e queijo) foram avaliadas por PCR, por meio da amplificação de um fragmento de 3375pb (denominado *egc* parcial), que foi utilizado como marcador da presença do cluster, e fragmentos de cada um dos genes pertencentes ao cluster *egc*. Há presença de genes do cluster *egc* em isolados de *S. aureus* isoladas em alimentos de origem animal; entretanto, diferentes genótipos puderam ser observados em função da fonte de isolamento. A ocorrência de *S. aureus* isolados em carne de frango que possuíam todos os genes do cluster foi elevada; no entanto, nos isolados oriundos dos demais alimentos, essa ocorrência foi reduzida.

Palavras-chave: cluster de genes, enterotoxinas estafilocócicas, contaminação, produtos de origem animal, PCR.

ABSTRACT

The aim of this study was to detect, through PCR usage, the genes which encodes staphylococcal enterotoxins and which belongs to *egc* cluster (*seg*, *sei*, *selm*, *seln* and *selo*) in *S. aureus* isolated from different foods of animal origin and correlate their presence with the strain origin. Forty-one strains of *S. aureus* from different sources (chicken meat, raw milk, sausage meat and cheese) were evaluated through PCR by amplifying a fragment of 3375bp (called partial *egc*), which was used as a marker for the presence of cluster, and fragments

of individual genes belonging to *egc* cluster. There is presence of the *egc* cluster in strains of *S. aureus* isolated from foods of animal origin, however, different genotypes could be observed depending on the isolation source. The occurrence of strains isolated from chicken meat that had all the genes of the cluster was high; however, in the strains isolated from the other foods, such occurrence has been reduced.

Key words: *egc* cluster, staphylococcal enterotoxins, contamination, foods of animal origin, PCR.

INTRODUÇÃO

O gênero *Staphylococcus* é formado por 41 espécies e 24 subespécies (EUZÉBY, 2009). Entre as bactérias desse gênero, *S. aureus* é a mais relacionada a casos e a surtos de intoxicação alimentar em razão da sua capacidade de produzir enterotoxinas (EE) (CENCI-GOGA et al., 2003). Vinte e duas EE já foram descritas e 10 foram envolvidas com intoxicação alimentar (EEA, EEB, EEC₁, EEC₂, EEC₃, EED, EEE, EEG, EEH e EEI) (CENCI-GOGA et al., 2003). Embora a maioria dos casos e surtos de intoxicação alimentar estafilocócica seja atribuída às EE clássicas (EEA à EEE) (CHEN et al., 2004), o recente avanço dos métodos de diagnóstico permitiu a identificação de casos de intoxicação alimentar envolvendo EEG, EEH e EEI, indicando que a importância das “novas” EE pode estar sendo subestimada (CHEN et al., 2004; CENCI-GOGA et al., 2003).

^IColegiado de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF), Rodovia BR 407, km 12, Lote 543, 56300-990, Petrolina, PE, Brasil. Email: fernando.zocche@univasf.edu.br. Autor para correspondência.

^{II}Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Pelotas, RS, Brasil.

Em *S. aureus*, diversos genes codificadores de fatores de virulência estão presentes em elementos genéticos móveis, tais como ilhas de patogenicidade (SaPI), profagos e plasmídeos (JARRAUD et al., 2001). Dentre as quatro ilhas de patogenicidade descritas em *S. aureus*, SaPI3 tem grande importância por reunir genes de EE em um *cluster* denominado *enterotoxin gene cluster* ou *cluster egc*, o qual agrupa os genes codificadores de EEG (*seg*), EEI (*sei*), EEIM (*selm*), EEIN (*seln*) e EEIO (*selo*), além de dois pseudogenes (*øent1* e *øent2*), ainda sem função biológica determinada (JARRAUD et al., 2001; van BELKUM et al., 2006). Esse *cluster* é descrito por alguns autores (JARRAUD et al., 2001; THOMAS et al., 2006) como “berço” das EE, em que, a partir de eventos de recombinação genética, 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 (JARRAUD et al., 2001; THOMAS et al., 2006).

Alimentos preparados com produtos de origem animal são os mais envolvidos em casos e/ou surtos de intoxicação alimentar estafilocócica (CENCIOGA et al., 2003); portanto, a pesquisa de *S. aureus* nesses alimentos e a avaliação de seu potencial em produzir enterotoxinas são fatores extremamente importantes na investigação epidemiológica e em análises de risco para essa doença (LANCETTE e BENNETT, 2001). Assim sendo, os objetivos deste estudo foram detectar, por PCR, genes pertencentes ao *cluster egc* em *S. aureus* isolados em diferentes alimentos de origem animal, e relacionar sua presença com a fonte de isolamento.

MATERIAL E MÉTODOS

O isolamento e a identificação dos isolados de *S. aureus* nos alimentos (carne de frango, embutidos cárneos, leite cru, queijos) foram realizados de acordo com LANCETTE e BENNETT (2001), entre os anos de 2004 e 2008, na cidade de Pelotas, Rio Grande do Sul (RS). Dos 41 isolados, 14 foram oriundos de carne de frango, 14 de leite cru, oito de embutidos cárneos e cinco de queijo. As cepas de referência utilizadas foram *S. aureus* FRI361 e *S. aureus* FRI472, as quais são portadoras dos genes-alvo deste estudo.

A extração de DNA genômico 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 Triptona Soja (TSA - Acumedia®) incubada a 37°C, por 24 horas, para 100µL de tampão Tris-EDTA (10mM Tris base e 5mM EDTA, pH 7,8) até turbidez 1,0 da escala de MacFarland. A lise do peptidoglicano celular ocorreu pela adição de 100µL de lisostafina (100µg mL⁻¹, Sigma®) e incubação a 37°C, em banho-maria, por 45 minutos. Para completar a lise celular, foram adicionados 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⁻¹, Invitrogen®) e incubados em banho-maria, a 37°C, por uma hora. Em seguida, foram adicionados 200µL de solução NaCl 5M e agitados manualmente, por 15 segundos. Separou-se o material intracelular por meio de centrifugação a 10.000x g, por 15 minutos, a 4°C, e transferiu-se o sobrenadante para um novo microtubo. Adicionou-se fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1) para a liberação e separação de proteínas e, em seguida, centrifugou-se a 10.000x g, por 15 minutos, transferindo-se o sobrenadante para um novo microtubo. A precipitação do DNA foi realizada com 800µL de álcool etílico absoluto gelado, e a manutenção em -20°C por, no mínimo, duas horas. Em seguida, foi realizada nova centrifugação a 10.000x g, por 15 minutos, 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%, comparando-se com o padrão de massa molecular DNAλ/*Hind*III (Invitrogen®).

Os oligonucleotídeos utilizados para amplificação dos fragmentos dos genes *seg*, *sei*, *selm*, *seln* e *selo* e para amplificação de um fragmento de 3375pb do *cluster egc* (denominado *egc* parcial) estão descritos na tabela 1. Os oligonucleotídeos *sei* 1 e *seg* 2 (Tabela 1) foram desenhados para amplificar um fragmento de 3375pb, o qual inclui as sequências nucleotídicas completas dos genes *sei*, *øent1*, *øent2*, *seln*, além de 610 nucleotídeos do gene *seg* e 47 nucleotídeos do gene *selm*, utilizando-se uma PCR proposta por BLAIOTTA et al. (2004), com adaptações. As condições de reação foram: 12pmol de cada um dos oligonucleotídeos, 0,18mM de dNTP mix, 0,125mM de cloreto de magnésio, solução tampão para PCR contendo 2,5mM de KCl e 1,0mM de Tris-HCl (pH 8,4), 2,5U de Taq DNA polimerase (Invitrogen®) e água ultra pura esterilizada, totalizando 50µL por tubo. Quantidades entre 10 e 100ng de DNA foram utilizadas como molde para a PCR. A amplificação foi realizada em termociclador PTC – 100 (*MJ Research - Peltier Thermal Cycler*), com desnaturação do DNA a 95°C, por três minutos, seguida de 30 ciclos (95°C/10 segundos, 72°C por 3,5 minutos) e de extensão final a

Tabela 1 - Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na detecção de genes do *cluster egc* e de um fragmento de 3375pb (*egc* parcial) em *S. aureus* isolados de alimentos de origem animal.

Oligonucleotídeo/ gene alvo	Sequência 5'→3'	Posição no <i>cluster</i> *	Fragmentos estimados (pb ¹)	Referência
seg 1/ <i>seg</i>	TGCTATCGACACACTACAACC	4758-4778	704	McLAUHLIN et al. (2000)
seg 2**/ <i>seg</i>	CCAGATTCAAATGCAGAACC	5461-5442		
sei 1**/ <i>sei</i>	GACAACAAAACACTGTCGAAACTG	2087-2108	630	
sei 2/ <i>sei</i>	CCATATTCTTTGCCTTACCAG	2716-2695		
<i>selm</i> 1/ <i>selm</i>	CCAATTGAAGACCACCAAAG	1544-1563	517	BLAIOTTA et al. (2004)
<i>selm</i> 2/ <i>selm</i>	CTTGTCTCTGTTCCAGTATCA	2060-2042		
<i>seln</i> 1/ <i>seln</i>	ATTGTTCTACATAGCTGCAA	3818-3837	682	
<i>seln</i> 2/ <i>seln</i>	TTGAAAAAACTCTGCTCCCA	4499-4480		
<i>selo</i> 1/ <i>selo</i>	AGTCAAGTGTAGACCCTATT	494-513	534	
<i>selo</i> 2/ <i>selo</i>	TATGCTCCGAATGAGAATGA	1027-1008		

*original accession number – AF285760 (Genbank); **sei 1 e seg 2: oligonucleotídeos utilizados para amplificação parcial de *egc*, correspondente a 3375pb; ¹pb = pares de base.

72°C, por sete minutos. Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% contendo brometo de etídeo e visualizados sob iluminação ultravioleta. O marcador de massa molecular utilizado foi o DNA λ /HindIII (Invitrogen®).

Para amplificação dos genes *seg*, *sei*, *selm*, *seln* e *selo*, utilizou-se PCR uniplex conforme protocolo previamente descrito por BLAIOTTA et al. (2004), com modificações. As condições de reação foram: 10pmol de cada um dos oligonucleotídeos (Tabela 1), 0,025mM de dNTP mix, 0,0625mM de cloreto de magnésio, solução tampão para PCR contendo 1,25mM de KCl e 0,5mM de Tris-HCl (pH 8,4), 1U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen®) e água ultra pura esterilizada, com volume final de 25µL por tubo. Quantidades entre 10 e 100ng de DNA foram utilizadas como molde para a PCR. As amplificações foram realizadas em termociclador PTC-100 (*MJ Research, Peltier Thermal Cycler*), desnaturando-se o DNA a 95°C, por três minutos, seguido de 30 ciclos (95°C/10 segundos, 55°C/75 segundos) e de extensão final a 72°C, por sete minutos. Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,2% contendo brometo de etídeo e visualizados sob iluminação ultravioleta. O marcador de massa molecular utilizado foi o 100pb DNA Ladder (Invitrogen®).

Os produtos de PCR obtidos com os oligonucleotídeos *sei* 1 e *seg* 2 a partir do DNA de *S. aureus* FRI361 e *S. aureus* FRI472 foram purificados por *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (Amersham Biosciences®) e digeridos individualmente com *HindIII* (Invitrogen®) e *EcoRI* (Invitrogen®). Inicialmente, digeriu-se o fragmento *egc* parcial com

HindIII, sendo utilizados 25µL de DNA purificado, 1µL de *HindIII* (20 unidades de enzima), 3µL do tampão recomendado pelo fabricante e específico para a enzima, água ultra pura esterilizada (q.s.p.) num volume final de 30µL e incubados a 37°C, por duas horas. Em seguida, o produto foi novamente purificado por *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit* e digerido com *EcoRI*, sendo utilizados 25µL de DNA purificado, 1µL de *EcoRI* (20 unidades de enzima), 3µL do tampão recomendado pelo fabricante e específico para a enzima, água ultra pura esterilizada (q.s.p.) num volume final de 30µL e incubados a 37°C, por duas horas. Após a digestão com as duas enzimas, os fragmentos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% e comparados com o marcador de massa molecular GeneRuler 1kb DNA Ladder plus (Fermentas®).

Os resultados foram analisados por meio de análise de variância (ANOVA), e as possíveis diferenças ($P > 0,05$) foram analisadas pelo teste de Tukey, utilizando-se o Programa Statistics 8.0 (STATSOFT, 2003).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A relação entre a presença do *cluster egc* e patogenicidade tem sido descrita em cepas de *S. aureus* isoladas de fontes clínicas (van BELKUM et al., 2006) entretanto, com cepas isoladas em alimentos, o número de trabalhos é bastante reduzido (BANIA et al., 2006; HWANG et al., 2007; LAWRYNOWICZ-PACIOREK et al., 2007). Dessa forma, os objetivos foram avaliar a presença desse *cluster* em *S. aureus* isolados em

alimentos de origem animal e verificar se há correlação com a fonte de isolamento.

Os oligonucleotídeos iniciadores *sei* 1 e *seg* 2 foram específicos para o fragmento de 3375pb (*egc* parcial), o que pode ser comprovado por meio da digestão dos produtos de PCR com as enzimas *EcoRI* e *HindIII*, sendo obtidos fragmentos de 1654pb, 1085pb e 636pb, conforme descrito por JARRAUD et al. (2001) e BLAIOTTA et al. (2004). Os fragmentos gerados com a PCR e após a digestão podem ser observados na figura 1.

O *egc* parcial mostrou-se um bom marcador da presença do *cluster egc*. Em 10 das 41 cepas avaliadas, houve amplificação do fragmento *egc* parcial e amplificação individual de cada um dos genes componentes do *cluster*. Além disso, nas outras cepas (31), não houve amplificação do fragmento *egc* parcial quando um ou mais genes estavam ausentes, como foi observado em três cepas que carregavam os genes *seg*, *selm*, *seln* e *selo*, em duas que possuíam o gene *seln*, e nas demais que não carregavam genes desse *cluster*. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação de fragmentos dos genes *seg*, *sei*, *selm*, *seln* e *selo* foram específicos para os respectivos genes, conforme pode ser observado pelos produtos de PCR obtidos e mostrados na figura 1.

Na tabela 2, são apresentados os diferentes genótipos de *S. aureus* quanto ao *cluster egc* em cepas

isoladas em alimentos de origem animal, em Pelotas, RS. Verifica-se que houve diferença estatística significativa quanto à presença do *cluster egc* entre as cepas isoladas de carne de frango e aquelas isoladas de outras fontes. Dez cepas portavam o *cluster egc* completo (genes *seg*, *sei*, *selm*, *seln* e *selo*); entretanto, apenas uma (10%) foi isolada em embutidos cárneos, índice semelhante ao relatado por BANIA et al. (2006), os quais, analisando 50 cepas de *S. aureus* isoladas desses alimentos, encontraram 6% com essa característica. As outras nove cepas (90%) de *S. aureus* que portavam o *cluster egc* completo foram isoladas de carne de frango, porcentagem semelhante à relatada por SMYTH et al. (2005), que avaliaram 15 cepas de *S. aureus* oriundas de frango e encontraram 86,7% das cepas carregando esses genes. Por outro lado, HWANG et al. (2007) caracterizaram molecularmente 87 cepas de *S. aureus* isoladas desse mesmo alimento e observaram que 36,9% possuíam *egc* completo. É interessante ressaltar que nesses três estudos todas as cepas provenientes de frangos possuíam o *cluster* completo, não havendo variantes genéticas quanto a essa característica, o que pode denotar a necessidade da presença simultânea dos cinco genes do *cluster* para um adequado estabelecimento de *S. aureus* naquele hospedeiro e, conseqüentemente, para o provável desenvolvimento de patogenias. Outra hipótese que pode ser levantada é que, em frangos, há uma

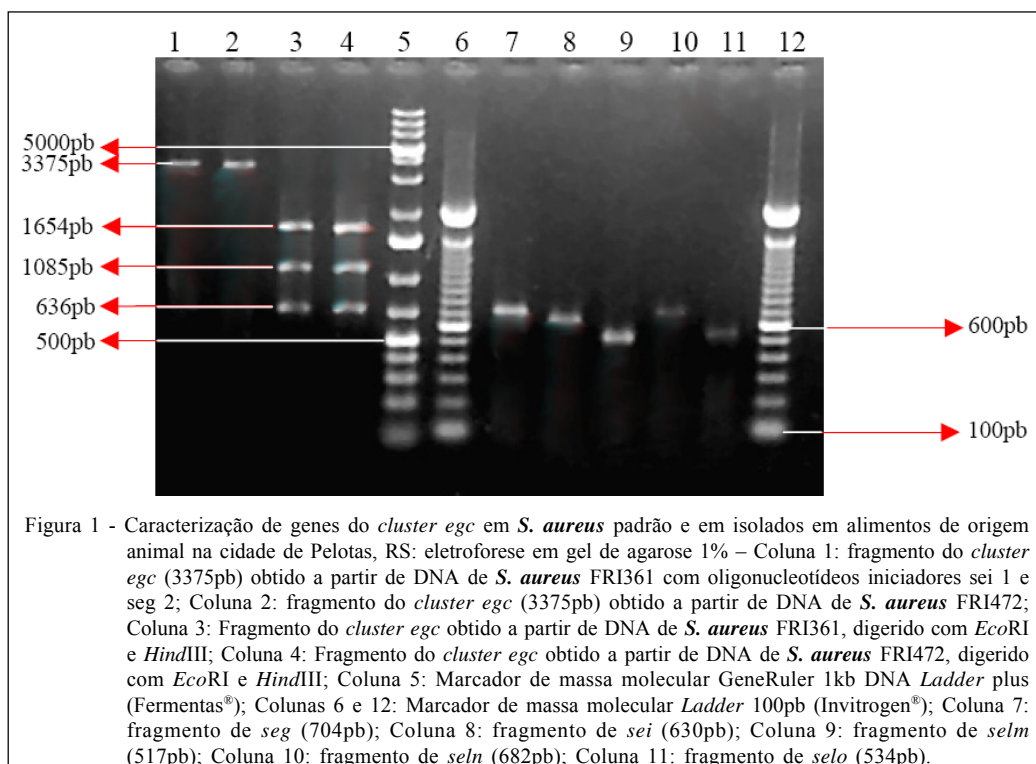


Figura 1 - Caracterização de genes do *cluster egc* em *S. aureus* padrão e em isolados em alimentos de origem animal na cidade de Pelotas, RS: eletroforese em gel de agarose 1% – Coluna 1: fragmento do *cluster egc* (3375pb) obtido a partir de DNA de *S. aureus* FRI361 com oligonucleotídeos iniciadores *sei* 1 e *seg* 2; Coluna 2: fragmento do *cluster egc* (3375pb) obtido a partir de DNA de *S. aureus* FRI472; Coluna 3: Fragmento do *cluster egc* obtido a partir de DNA de *S. aureus* FRI361, digerido com *EcoRI* e *HindIII*; Coluna 4: Fragmento do *cluster egc* obtido a partir de DNA de *S. aureus* FRI472, digerido com *EcoRI* e *HindIII*; Coluna 5: Marcador de massa molecular GeneRuler 1kb DNA Ladder plus (Fermentas®); 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* (630pb); Coluna 10: fragmento de *seln* (682pb); Coluna 11: fragmento de *selo* (534pb).

Tabela 2 - Distribuição e porcentagem dos diferentes genótipos do *cluster egc* em *S. aureus* isolados em alimentos de origem animal na cidade de Pelotas, RS.

Genótipos	-----Fonte de isolamento e número de cepas-----									
	Carne de frango (n=14*)		Embutidos cárneos (n=8*)		Queijo (n=5*)		Leite cru (n=14*)		Total (n=41)	
	n	%	n	%	n	%	N	%	n	%
<i>egc</i> ⁽⁻⁾ **	5 ^b	35,8	4 ^b	50	3 ^b	60	14 ^a	100	26	63,4
<i>egc</i> ⁽⁺⁾ ***	9 ^a	64,2	1 ^b	12,5	- ^b	-	- ^b	-	10	24,4
<i>seg, selm, seln, selo</i>	- ^b	-	1 ^{ab}	12,5	2 ^a	40	- ^b	-	3	7,3
<i>seln</i>	- ^b	-	2 ^a	25	- ^b	-	- ^b	-	2	4,9

* Números amostrais seguidos pelas mesmas letras nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey, com 5% de probabilidade.

** não portadores de gene pertencente ao *cluster egc*.

*** portadores de todos os genes do *cluster egc*: *seg, sei, selm, seln, selo*.

distribuição clonal de *S. aureus* que carregam o *cluster egc* completo.

Cinco cepas albergavam um ou mais genes do *cluster*, mas não o *egc* completo. Uma cepa proveniente de embutidos cárneos e duas de queijos carregavam os genes *seg, selm, seln* e *selo*. Duas cepas, isoladas em embutidos, possuíam apenas o gene *seln*. Uma hipótese para a presença de cepas de *S. aureus* com *cluster egc* incompleto é o alto nível de polimorfismo genético que esse *cluster* pode apresentar (BLAIOTTA et al., 2004; THOMAS et al., 2006). Um resultado interessante foi que três cepas (uma isolada em embutidos e duas em queijos) não carregavam o gene *sei*, embora o gene *seg* tenha sido detectado, haja vista que há controvérsias na literatura em relação à necessidade da coexistência desses genes em uma mesma cepa. JARRAUD et al., (2001) e NITZSCHE et al. (2007), por exemplo, descrevem que cepas que possuem um desses genes, necessariamente, carrearão o outro. CHEN et al. (2004) relatam que uma cepa de *S. aureus* pode carrear o gene *seg* sem necessariamente possuir o gene *sei*, semelhantemente ao encontrado neste estudo. THOMAS et al. (2006) avaliaram 666 cepas clínicas de *S. aureus*, encontrando apenas uma que não apresentava o gene *sei* e descrevem que nessa cepa havia dois tipos de sequência de inserção posicionados na região cromossômica onde deveria estar localizado esse gene. Esses autores sugerem que esse fenômeno ocorre quando parte do *cluster egc* é exportado ou inserido no cromossomo de cepas que estão passando por um processo de evolução gênica, e que, durante a transposição do material genético, pode ocorrer a integração total ou parcial de um gene não alvo. Embora essa hipótese não tenha sido testada neste estudo, há possibilidade de as cepas que não

possuíam o gene *sei* serem cepas que estejam sofrendo ou já sofreram eventos de transposição de DNA.

É interessante salientar que, nas cepas isoladas em leite cru, não houve presença de genes do *cluster egc*. Outro estudo (ZOCCHÉ et al., 2009) conduzido no Rio Grande do Sul já havia demonstrado a baixa ocorrência de *S. aureus* enterotoxigênicos nesse alimento, 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*. Esses resultados vêm ao encontro de diversos estudos (CENCI-GOGA et al., 2003; NITZSCHE et al., 2007) que demonstraram alta variabilidade genética entre cepas de *S. aureus* e que atribuem essa distinta enterotoxigenicidade a uma necessidade de adaptação do microrganismo ao ambiente e/ou hospedeiro. Por outro lado, duas cepas isoladas em queijo apresentaram *cluster egc* incompleto, o que faz supor que essas cepas tenham tido outra origem que não o leite. Uma provável fonte de contaminação pode ter sido os manipuladores de alimentos, uma vez que esses produtos sofrem alta manipulação após a pasteurização do leite, hipótese que pode ser corroborada pelo estudo de LAWRYNOWICZ-PACIOREK et al. (2007), os quais encontraram o *cluster egc* em *S. aureus* isolados de fossas nasais de manipuladores de alimentos.

Observa-se, pelos diferentes genótipos encontrados, que o perfil enterotoxigênico das cepas de *S. aureus* variou de acordo com o alimento de onde o microrganismo foi isolado, e houve relação entre a presença de determinados genes de EE e a procedência da bactéria ($P > 0,05$), conforme pode ser observado pela tabela 2. A heterogeneidade genética observada pode ser explicada pela necessidade de a bactéria portar determinados genes, os quais favoreceriam seu

estabelecimento em um hospedeiro e/ou alimento. Diversos trabalhos corroboram essa hipótese e descrevem um perfil toxigênico distinto e bastante amplo em *S. aureus* encontrados em alimentos de origem animal, como derivados lácteos (BLAIOTTA et al., 2004), embutidos cárneos (BANIA et al., 2006) 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 (NITZSCHE et al., 2007; HWANG et al., 2007).

CONCLUSÃO

Há presença de genes do *cluster egc* em *S. aureus* isolados em alimentos de origem animal, na cidade de Pelotas, RS. Entretanto, diferentes genótipos podem ser observados de acordo com a sua fonte de isolamento ($P > 0,05$). Em *S. aureus* isolados de frangos, a presença do *cluster egc* completo é elevada.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, processo 478100/04-3, pelo suporte financeiro; à Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela concessão de bolsa PRODOC e à Márcia Magalhães Mata, pela análise estatística.

REFERÊNCIAS

- BANIA, J. et al. Distribution of newly described enterotoxin-like genes in *Staphylococcus aureus* from food. **International Journal of Food Microbiology**, v.108, p.36-41, 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2005.10.013>>. Acesso em: 30 mar. 2010. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2005.10.013.
- BLAIOTTA, G. et al. PCR detection of staphylococcal enterotoxin genes in *Staphylococcus* spp. strains isolated from meat and dairy products. Evidence for new variants of seG and seI in *S. aureus* AB-8802. **Journal of Applied Microbiology**, v.97, p.719-730, 2004. Disponível em: <<http://dx.doi.org/doi:10.1111/j.1365-2672.2004.02349.x>>. Acesso em: 30 mar. 2010. doi: 10.1111/j.1365-2672.2004.02349.x.
- CENCI-GOGA, B.T. et al. Enterotoxin production by *Staphylococcus aureus* isolated from mastitic cows. **Journal of Food Protection**, v.66, p.1693-1696, 2003.
- CHEN, T. R. et al. 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. **International Journal of Food Microbiology**, v.92, p.189-197, 2004. Disponível em: <<http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2003.10.002>>. Acesso em: 30 mar. 2010. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2003.10.002.
- EUZÉBY, J.P. **List of bacterial names with standing in nomenclature**. Disponível em: <<http://www.bacterio.cict.fr/s/staphylococcus.html>>. On line. Acesso em: 06 set. 2009.
- HWANG, S.Y. et al. 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. Disponível em: <<http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.02.013>>. Acesso em: 30 mar. 2010. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.02.013.
- JARRAUD, S. et al. *egc*, highly prevalent operon of enterotoxin gene, forms a putative nursery of superantigens in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Immunology**, v.166, p.669-677, 2001. Nota de correção em: **Journal of Immunology**, v.166, p.4260, 2001. Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/cgi/content/full/166/1/669>>. Acesso em: 30 mar. 2010.
- LANCETTE, G.A.; BENNETT, R.W. *Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxins. In: DOWNES, F.P.; ITO, K. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. Washington: American Public Health Association (APHA), 2001. Cap.39, p.387-400.
- LAWRYNOWICZ-PACIOREK, M. et al. The distribution of enterotoxin and enterotoxin-like genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from nasal carriers and food samples. **International Journal of Food Microbiology**, v.117, p.319-323, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.03.009>>. Acesso em: 30 mar. 2010. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.03.009.
- MATTHEWS, K.R. et al. Identification and differentiation of coagulase-negative *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction. **Journal of Food Protection**, v.60, p.686-688, 1997. Disponível em: <<http://www.ingentaconnect.com/content/iafp/jfp/1997/00000060/00000006/art00015>>. Acesso em: 30 mar. 2010.
- McLAUHLIN, J. et al. The detection of enterotoxins and toxic shock syndrome toxin genes in *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction. **Journal of Food Protection**, v.63, p.479-488, 2000. Disponível em: <<http://www.ingentaconnect.com/content/iafp/jfp/2000/00000063/00000004/art00009>>. Acesso em: 30 mar. 2010.
- NITZSCHE, S. et al. Phenotypic and genotypic traits of *Staphylococcus aureus* strains isolated from pig carcasses. **Veterinary Microbiology**, v.120, p.292-299, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.vetmic.2006.10.027>>. Acesso em: 30 mar. 2010. doi:10.1016/j.vetmic.2006.10.027.
- 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. Disponível em: <<http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.foodcont.2006.12.007>>. Acesso em: 30 mar. 2010. doi:10.1016/j.foodcont.2006.12.007.
- SMYTH, D.S. et al. Superantigen genes encoded by the *egc* cluster and SaPI_{bov} are predominant among *Staphylococcus aureus* isolated from cows, goats, sheep, rabbits and poultry. **Journal of Medical Microbiology**, v.54, p.401-411, 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/doi:10.1099/jmm.0.45863-0>>. Acesso em: 30 mar. 2010. doi:10.1099/jmm.0.45863-0.
- STAMFORD, T.L.M. et al. Enterotoxigenicidade de *Staphylococcus* spp. isolados de leite *in natura*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, p.41-45, 2006. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/doi:10.1590/S0101-20612006000100007>>. Acesso em: 30 mar. 2010. doi:10.1590/S0101-20612006000100007.

STATSOFT, INC. **Statistica for Windows, Versão 8.0.** Tulsa: StatSoft, 2003. Disponível em: <<http://www.statsoft.com>>. Online. Acesso em: 06 fev. 2010.

THOMAS, D.Y. et al. Staphylococcal enterotoxin-like toxins U2 and V, two new staphylococcal superantigens arising from recombination within the enterotoxin gene cluster. **Infection and Immunity**, v.74, p.4724-4734, 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/doi:10.1128/IAI.00132-06>>. Acesso em: 30 mar. 2010. doi:10.1128/IAI.00132-06.

van BELKUM, A. et al. Clonal distribution and differential occurrence of the enterotoxin gene cluster, *egc*, in carriage-versus bacteremia-associated isolates of *Staphylococcus aureus*.

Journal of Clinical Microbiology, v.44, p.1555-1557, 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/doi:10.1128/JCM.44.4.1555-1557.2006>>. Acesso em: 30 mar. 2010. doi:10.1128/JCM.44.4.1555-1557.2006.

VIMERCATI, C. et al. Molecular typing of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Veterinary Medicine**, v.53, p.423-428, 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/doi:10.1111/j.1439-0450.2006.00980.x>>. Acesso em: 30 mar 2010. doi:10.1111/j.1439-0450.2006.00980.x.

ZOCHE, F. et al. PCR multiplex para detecção de *Staphylococcus aureus* enterotoxigênicos isolados em alimentos de origem animal no sul do Rio Grande do Sul, Brasil. **Interciencia**, v.34, p.487-491, 2009. Disponível em: <http://www.interciencia.org/v34_07/index.html>. Acesso em 30 mar. 2010.