

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia
de Alimentos



Tese

**Detecção, prevalência e expressão de genes de
enterotoxinas clássicas de *Staphylococcus aureus*
isolados de alimentos e surtos**

Caroline Peixoto Bastos

Pelotas, 2013

CAROLINE PEIXOTO BASTOS

DETECÇÃO, PREVALÊNCIA E EXPRESSÃO DE GENES DE ENTEROTOXINAS CLÁSSICAS DE *Staphylococcus aureus* ISOLADOS DE ALIMENTOS E SURTOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Professor Doutor Wladimir Padilha da Silva

Pelotas, 2013

Dados de catalogação na fonte:

(Marlene Cravo Castillo – CRB-10/744)

B327d Bastos, Caroline Peixoto

Detecção, prevalência e expressão de genes de enterotoxinas clássicas de *Staphylococcus aureus* isolados de alimentos e surtos / Caroline Peixoto Bastos ; orientador Wladimir Padilha da Silva. - Pelotas, 2013.-91f. : il.- Tese (Doutorado) –Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel . Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2013.

1.*Staphylococcus aureus* . 2.Enterotoxina estafilocócica clássica 3.Expressão gênica 4.qPCR I.Silva, Wladimir Padilha da(orientador) II.Título.

CDD 576.163

Banca examinadora:

Profa. Dra. Ângela Maria Fiorentini

Prof. Dr. Celso Medina Fagundes

Profa. Dra. Eduarda Hallal Duval

Dr. Marcelo Mendonça

Prof. Dr. Wladimir Padilha da Silva (Orientador)

Agradeço...

A Deus que sempre me iluminou.

A Universidade Federal de Pelotas, em especial ao Programa de Pós-Graduação em
Ciência e Tecnologia Agroindustrial, que permitiu a realização deste trabalho e a
Capes pela concessão da bolsa de estudo.

Ao Professor e amigo Wladimir Padilha da Silva, pela valiosa orientação, confiança e
ensinamentos.

Aos meus amigos do Laboratório de Microbiologia de Alimentos.

Aos meus amados pais Airton e Lúcia que sempre me incentivaram e me mostraram
a importância do estudo.

Ao Ricardo, meu amor, por estar sempre junto a mim.

A minha filha Ana Luiza, meu maior amor.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram de alguma forma para a
realização deste trabalho.

Meu muito obrigada!

Resumo

BASTOS, Caroline Peixoto. **Detecção, prevalência e expressão de genes de enterotoxinas clássicas de *Staphylococcus aureus* isolados de alimentos e surtos**. 2013. 91f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) é, entre as bactérias do gênero *Staphylococcus*, a espécie mais relacionada a casos e/ou surtos de intoxicação alimentar, os quais são causados pelas enterotoxinas estafilocócicas (EE). Estas bactérias podem ser facilmente encontradas em alimentos de origem animal. Das 22 EE descritas na literatura, aproximadamente 95% dos surtos de intoxicação alimentar estão associados às EE clássicas (EEA, EEB, EEC, EED e EEE). Sendo assim, este trabalho teve como objetivos verificar a presença e os níveis de expressão dos genes das EE clássicas em 13 *S. aureus* provenientes de diferentes surtos de intoxicação estafilocócica ocorridos no estado do Rio Grande do Sul (RS), e em *S. aureus* isolados de carcaça de frango no sul do Brasil, por PCR e por PCR em tempo Real (qPCR). Além disso, avaliou-se os efeitos da temperatura (8°C e 12°C) e da concentração salina (2,5% NaCl) sobre os níveis de expressão transcricional dos genes das EE clássicas em *S. aureus* através da análise do mRNA. Observou-se que, com exceção de dois isolados provenientes dos surtos, os demais apresentaram expressão transcricional igual ou maior que a das cepas padrão, para, pelo menos, um dos genes das enterotoxinas clássicas. Além disso, observou-se que quatro isolados expressaram genes de uma enterotoxina, enquanto os demais apresentaram expressão dos genes de, no mínimo, duas enterotoxinas. Embora não se tenha informação a respeito de qual enterotoxina causou a intoxicação alimentar nos surtos avaliados, a prevalência das EE clássicas, associada aos elevados níveis de expressão transcricional encontrados, demonstram que uma ou mais EE clássicas causaram os surtos de intoxicação alimentar nos quais os isolados de *S. aureus* foram obtidos. Doze isolados de *S. aureus* provenientes de carcaças de

frango portavam os genes dessas EE, sendo que em apenas cinco observou-se sua expressão transcricional. Nos cinco isolados houve expressão de mais de um gene de EE, demonstrando seu potencial toxigênico. Estes cinco isolados e as cepas padrão foram submetidos a quatro tratamentos: 1) nas condições ideais de multiplicação de *S. aureus*; 2) em concentração salina de 2,5% de NaCl; 3) com incubação em temperatura de 12°C e; 4) com incubação em temperatura de 8°C. A concentração salina e as baixas temperaturas interferem na expressão dos genes das EE clássicas, diminuindo seus valores, entretanto, mesmo em concentração salina de 2,5% e em temperatura de 12°C os isolados expressaram os genes de EE clássicas, demonstrando seu potencial toxigênico. Temperaturas de 8°C mostraram-se mais eficientes no controle da expressão gênica das EE clássicas de *S. aureus*.

Palavras-chave: *Staphylococcus aureus*. Enterotoxina estafilocócica clássica. Expressão gênica. qPCR.

Abstract

BASTOS, Caroline Peixoto. **Detection, expression and prevalence of genes of classic enterotoxins of *Staphylococcus aureus* isolated from food and outbreaks.** 2013. 91f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) is among the bacteria of the genus *Staphylococcus*, species more related to cases and/or outbreaks of food poisoning, which are caused by staphylococcal enterotoxins (SE). These bacteria can be easily found in foods of animal origin. From the 22 SE described in the bibliography, approximately 95% of food poisoning outbreaks are associated to classic SE (SEA, SEB, SEC, SED and SEE). Thus, this study aimed at verifying the presence and the levels of expression of genes of classic SE in 13 *S. aureus* derived from different staphylococcal food poisoning outbreaks which took place in the state of Rio Grande do Sul (RS) and *S. aureus* isolated of chicken carcass in southern Brazil, by PCR and PCR real time (qPCR). Moreover, evaluated the effects of temperature (8° and 12°C) and saline concentration (2,5% NaCl) in the levels of transcriptional expression of genes of classic SE *S. aureus* through mRNA analysis. It has been observed that, with exception two isolated derived from outbreaks, the other have shown transcriptional expression equal or bigger than standard strain for at least one of the genes of classic enterotoxins. Moreover, it has been observed that four isolated have expressed genes of one enterotoxin, while the others have shown expressions of at least two enterotoxins genes. Although there is no information related to which enterotoxin has caused the food poisoning in the evaluated outbreaks, the prevalence of classic SE, along with high levels of transcriptional expression showed that one or more classic SE caused of food poisoning outbreaks in which the isolated of *S. aureus* were obtained. Twelve isolated of *S. aureus* originated from chicken carcass carried the genes of these SE, being that in only five has been observed the transcriptional expression. In the five isolated there was expression of

more of SE gene, demonstrating their potential toxigenic. These five isolates and standard strains were submitted to four treatments: 1) in ideal *S. aureus* multiplication; 2) in saline concentration of 2,5 of NaCl; 3) with incubation temperature of 12°C and; 4) with incubation in temperature of 8°C. The saline concentration and the low temperatures interfere in the expressions of genes of classic SE diminishing their values, nevertheless, even in saline concentration of 2,5 and in temperature of 12°C the isolated have expressed the genes of classic SE, demonstrating their toxigenic potential. Temperatures of 8°C have shown to be more efficient in the control of gene expression of *S. aureus* classic SE.

Keywords: *Staphylococcus aureus*. Classic staphylococcal enterotoxins. Gene expression. qPCR.

Sumário

1 Introdução.....	11
2 Objetivos.....	13
3 Revisão de literatura	14
3.1 <i>Staphylococcus</i> spp. e <i>Staphylococcus aureus</i>	14
3.2 Intoxicação alimentar estafilocócica	16
3.3 Enterotoxina Estafilocócica.....	20
3.4 PCR em tempo real (qPCR).....	26
4 Artigo 1: Prevalência e expressão de genes de enterotoxinas estafilocócicas clássicas de <i>S. aureus</i> isolados de surtos de intoxicação alimentar no Rio Grande do Sul, Brasil.	32
Resumo	33
Abstract.....	34
4.1 Introdução.....	35
4.2 Material e métodos	36
4.2.1 Confirmação da identidade de <i>S. aureus</i> , extração de DNA e amplificação dos genes das enterotoxinas clássicas por PCR.....	36
4.2.2 Extração de RNA e síntese de cDNA	37
4.2.3 PCR em tempo real (qPCR).....	38
4.3 Resultados e discussão.....	39
4.3.1 Identificação de <i>S. aureus</i> e dos genes das enterotoxinas clássicas por PCR	39
4.3.2 Expressão dos genes das enterotoxinas clássicas de <i>S. aureus</i> por PCR em tempo real (qPCR).....	41
4.4 Conclusão	44
4.5 Referências	45
5 Artigo 2: Presença e expressão de genes de enterotoxinas estafilocócicas clássicas em <i>S. aureus</i> isolados de carcaças de frango.....	50
Resumo	51
Abstract.....	52
5.1 Introdução.....	52

5.2 Material e métodos	53
5.2.1 Isolamento e identificação de <i>S. aureus</i>	53
5.2.2 Amplificação dos genes das EE clássicas por PCR.....	54
5.2.3 Expressão dos genes das EE clássicas por PCR em tempo real (qPCR).....	55
5.3. Resultados e discussão.....	56
5.3.1 Identificação dos genes das enterotoxinas clássicas por PCR.....	56
5.3.2 Expressão dos genes das enterotoxinas clássicas de <i>S. aureus</i> por PCR em tempo real (qPCR).....	57
5.4 Conclusão	60
5.5 Referências	60
6 Artigo 3: Efeito da temperatura e da concentração salina sobre os níveis de expressão transcricional dos genes das enterotoxinas estafilocócicas clássicas de <i>S. aureus</i> isolados de carcaça de frango.	65
Resumo	66
Abstract.....	67
6.1 Introdução.....	67
6.2 Material e métodos	69
6.2.1 Isolamento e identificação de <i>S. aureus</i>	69
6.2.2 Expressão dos genes das EE clássicas por PCR em tempo real sob diferentes condições de crescimento	69
6.3 Resultados e discussão.....	71
6.3.1 Expressão dos genes das enterotoxinas clássicas de <i>S. aureus</i> por PCR em tempo real (qPCR).....	71
6.4 Conclusão	76
6.5 Referências	76
Referências	80

1 Introdução

O gênero *Staphylococcus* é formado por 47 espécies e 24 subespécies. Entre as espécies deste gênero, a mais relacionada a casos e a surtos de intoxicação alimentar é *S. aureus* e é considerado um dos agentes etiológicos mais comuns de doenças bacterianas em todo o mundo devido à sua capacidade de produzir uma ampla gama de exotoxinas e outros fatores de virulência. Entre eles, as enterotoxinas estafilocócicas (EE), produzidas por algumas cepas de *S. aureus*, causam uma das doenças mais comuns transmitidas por alimentos, a intoxicação alimentar estafilocócica. Essa intoxicação é resultante do consumo de alimentos ou bebidas contendo a dose infectante de uma ou mais EE pré-formadas no alimento.

Vinte e duas EE foram descritas e 10 já foram associadas a intoxicações alimentares (EEA, EEB, EEC1, EEC2, EEC3, EED, EEE, EEG, EEH e EEI), sendo que as EE clássicas (EEA, EEB, EEC, EED e EEE) são as mais estudadas e responsáveis por, aproximadamente, 95% dos casos/surtos. Essas EE podem ser produzidas em grandes quantidades e são relativamente estáveis à inativação física e química, sendo que uma pequena quantidade (<1µg) já pode ser suficiente para causar os sintomas clínicos de intoxicação alimentar. Os sintomas surgem, geralmente, em 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.

Diversos surtos de intoxicação alimentar causados por *S. aureus* já foram descritos na literatura e os alimentos mais envolvidos são os de origem animal, principalmente aqueles que envolvem grande manipulação, portanto, a pesquisa de *S. aureus* nesses alimentos e a avaliação de seu potencial em produzir EE, são fatores extremamente importantes na investigação epidemiológica e na análise de risco dessa doença.

Muitos estudos têm avaliado a presença de genes das EE em *S. aureus* isolados de alimentos provenientes ou não de surtos, entretanto, poucos têm focado na análise de sua expressão. A técnica de PCR em tempo real ou quantitative PCR (qPCR) permite essa análise, monitorando o progresso da amplificação de cDNA em tempo real. É um dos métodos quantitativos mais sensíveis e confiáveis para análise de expressão gênica, permitindo detectar e quantificar quantidades muito pequenas de sequências específicas de ácidos nucleicos. Alguns autores citam que a quantidade de transcritos é correlacionada com a quantidade de EE produzida, logo, o nível de expressão de genes de EE poderia ser utilizado para avaliar o potencial toxigênico em diferentes isolados.

2 Objetivos

Avaliar a prevalência e expressão dos genes das enterotoxinas clássicas em isolados de *S. aureus* provenientes de diferentes surtos de intoxicação estafilocócica ocorridos entre 2002 e 2004 no estado do Rio Grande do Sul, Brasil, com base na análise do mRNA, verificando se há relação entre a presença de determinado gene de EE, seus níveis de expressão transcricional e o provável envolvimento no surto.

Verificar a presença e os níveis de expressão das EE clássicas (EEA, EEB, EEC, EED e EEE) em *S. aureus* isolados de carcaça de frango no sul do Rio Grande do Sul, Brasil.

Verificar os efeitos da temperatura (8°C e 12°C) e da concentração salina (2,5% NaCl) sobre os níveis de expressão transcricional dos genes das EE clássicas em *S. aureus* através da análise do mRNA.

3 Revisão de literatura

3.1 *Staphylococcus* spp. e *Staphylococcus aureus*

O gênero *Staphylococcus* compreende diversas espécies e subespécies, e possui uma distribuição ubiqüitária, sendo seu reservatório primário a pele e membranas mucosas, especialmente a região naso-faríngea de mamíferos e aves (ATANASSOVA et al., 2001). Apresentam forma de coco e tendem a formar agrupamentos semelhantes a cachos de uva. São Gram positivos, possuindo diâmetro variando entre 0,5 e 1,5mm, imóveis e não formam esporos. Possuem metabolismo fermentativo e respiratório, neste último, vindo a produzir catalase (VARNAN e EVANS, 1991; KLOOS e BANNERMAN, 1999).

Desde a sua proposição em 1884 por Rosenbach, o gênero *Staphylococcus* tem sido classificado dentro da família Micrococcaceae. Foi somente na última década, com o avanço da biologia molecular, estudos genéticos, perfis de ácidos graxos, composição da parede celular e, principalmente, estudos com RNA ribossômico 16S que o gênero *Staphylococcus* foi incluído numa nova família: Staphylococcaceae (GARRITY e HOLT, 2001). Atualmente o gênero é composto por 47 espécies e 24 subespécies (EUZÉBY, 2013), a maioria coagulase-negativa, caracterizando-se a exclusividade da síntese da enzima ao *S. aureus*, *S. schleiferi* subsp. *coagulans*, *S. intermedius*, *S. hyicus* e *S. delphini* (BANNERMAN, 2003). Algumas são frequentemente associadas a uma ampla variedade de infecções de caráter oportunista, tanto em seres humanos como em animais (TRABULSI et al., 2004). Dentre estas espécies, destaca-se *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) como a mais envolvida em doenças em seres humanos (KONEMAN et al., 2001).

Em alimentos, as espécies de maior importância são *S. aureus*, *S. hyicus* e *S. intermedius* (SU e WONG, 1997; FRANCO e LANDGRAF, 2008) sendo *S. aureus* a principal espécie associada aos casos de intoxicação alimentar, representando, em média, 98% dos surtos por este gênero (SANTANA et al., 2010).

S. aureus são bactérias mesófilas, apresentando temperatura de crescimento na faixa de 7°C a 47,8°C, no entanto, as enterotoxinas estafilocócicas são produzidas entre 10°C e 46°C, com um ótimo entre 40°C e 45°C, sendo que os extremos de temperatura estão na dependência dos demais parâmetros que devem encontrar-se em condições ótimas. As bactérias deste gênero são tolerantes a concentrações de 10% a 20% de NaCl, o que pode tornar os alimentos curados veículos potenciais para as mesmas. Em relação ao pH, *S. aureus* cresce na faixa de 4 a 9,8, com um ótimo entre 6 e 7. Em relação à atividade de água, o valor mínimo necessário para o micro-organismo se desenvolver é 0,86, embora sob condições ideais, esta bactéria já tenha se desenvolvido em atividade de água de 0,83 (FRANCO e LANDGRAF, 2008).

A presença de outros micro-organismos também é um ponto importante, pois *Staphylococcus* são considerados mal competidores (LOIR et al., 2003). Segundo Baird-Parker (1990), a temperatura para destruição do *S. aureus* varia entre 43seg e 8min a 60°C, onde as culturas mais jovens apresentam maior sensibilidade a esta mudança de temperatura.

A versatilidade nutricional e a capacidade de crescerem em diferentes condições ambientais fazem com que *S. aureus* desenvolva-se com facilidade em vários alimentos (CARMO et al., 2002; LOIR et al., 2003).

Staphylococcus aureus é uma das três espécies de cocos Gram positivos que são patogênicas para o homem. Estima-se que 25% da população humana seja carreador permanentes deste micro-organismo, sendo os fatores mais comuns que predispõe o hospedeiro a essa infecção, as injúrias de pele e mucosas, infecções virais, anormalidades metabólicas, como por exemplo, diabetes, e condições miscelâneas, como má nutrição e idade avançada. Uma vez instalado em seu hospedeiro, pode causar uma enorme variedade de sintomas clínicos, afetando a pele, pulmões, coração, sistema nervoso central, ossos e articulações, corrente sanguínea e trato gastrointestinal (BACHERT et al., 2002).

Muitos fatores de virulência contribuem para o potencial patogênico de *S. aureus*. Algumas linhagens podem formar uma cápsula de natureza polissacarídica, contribuindo para impedir a fagocitose do micro-organismo por células de defesa. Podem produzir e secretar a proteína A, a qual tem alta afinidade pela região Fc das moléculas de IgG, dificultando a ação do sistema imunológico. Produzem, além disso, uma série de enzimas, como a catalase, responsável pela degradação do

peróxido de hidrogênio, a coagulase, responsável pela formação de fibrina, que confere resistência a opsonização e fagocitose e a termonuclease (Tnase) responsável pela degradação do DNA e RNA em fosfomonucleosídeos (OLIVEIRA et al., 1999; KONEMAN et al., 2001). Utiliza-se a pesquisa da coagulase e da Tnase como indicadores mais aceitos quanto à presuntiva evidência da sua propriedade enterotoxigênica (PEREIRA et al., 2000). Além disso, *S. aureus* produz uma série de toxinas, às quais têm sido atribuída uma importante participação na patogenia das doenças causadas por este micro-organismo. Entre as toxinas produzidas, destacam-se as enterotoxinas, a esfoliatina, toxina da síndrome do choque tóxico (TSST), hemolisinas e leucocidinas (TRABULSI, et al., 2004).

Staphylococcus aureus pode causar vários tipos de intoxicações, seja durante um processo infeccioso, como por exemplo, a síndrome da pele escaldada, ou não, como nos casos da intoxicação alimentar e síndrome do choque tóxico.

3.2 Intoxicação alimentar estafilocócica

A intoxicação alimentar estafilocócica resulta do consumo de alimentos que contenham quantidades suficientes de uma (ou mais) enterotoxina pré-formada (DINGES et al., 2000; LOIR et al., 2003; NEMA et al., 2007) e é caracterizada por um curto período de incubação, geralmente 2 a 6 horas (BALABAN e RASOOLY, 2000).

Para a intoxicação alimentar estafilocócica acontecer, quatro fatores relacionados ao alimento devem ser considerados: 1) estar contaminado com estafilococos produtores de enterotoxina estafilocócica (EE); 2) apresentar condições intrínsecas para a multiplicação do micro-organismo; 3) estar acondicionado à uma temperatura e por um período adequados à multiplicação bacteriana até níveis capazes de produzir EE em quantidade suficiente para causar doença; e 4) ser consumido (NEWSOME e STEWART, 2004).

Staphylococcus aureus é, no gênero *Staphylococcus*, a espécie mais relacionada à intoxicação alimentar estafilocócica, no entanto, não é o micro-organismo em si o causador da doença e, sim, suas toxinas (NOVICK, 2003). Intoxicação alimentar estafilocócica tem um grande impacto na saúde pública. Estima-se que, a cada ano, nos Estados Unidos, ocorram mais de 185.000 casos dessa doença, causando cerca de 1.700 hospitalizações (MEAD et al., 1999), com

custos médicos e perda em produtividade estimada na ordem de 1,5 bilhão de dólares (CENCI-GOGA et al., 2003). No Brasil, poucas Unidades de Federação possuem um sistema de monitoramento epidemiológico de doenças transmitidas por alimentos. Merece destaque o Estado do Paraná, onde, no período compreendido entre os anos de 1978 e 2000, a intoxicação alimentar estafilocócica ocupou o primeiro lugar no ranking de doenças transmitidas por alimentos, com 492 surtos (41,2% no total) (AMSON et al., 2006). No entanto, os casos e surtos desta doença ainda são subestimados por várias razões, entre as quais se destacam: a doença apresenta um caráter autolimitante e raramente leva as pessoas envolvidas a procurarem auxílio médico; ser confundida com outros tipos de intoxicação alimentar que possuam sintomas semelhantes, como, por exemplo, a causada pela toxina emética de *Bacillus cereus*; inadequada coleta de amostras e análise laboratorial (BENNETT, 1986 apud NEWSOME e STEWART, 2004).

Staphylococcus aureus pode produzir uma ou mais EE simultaneamente (LETERTRE et al., 2003a; LETERTRE et al., 2003b; OMOE et al., 2005; ZSCHÖCK et al., 2005; SMYTH et al., 2006; ZOCHE et al., 2009). Embora *S. aureus* possa produzir uma grande variedade de enterotoxinas, apenas EEA, EEB, EEC1, EEC2, EEC3, EED, EEE, EEG, EEH e EEI foram envolvidas em casos e surtos de intoxicação alimentar (WALLIN-CARLQUIST et al., 2010), sendo 95% dos surtos causados por EEA, EEB, EEC, EED e EEE (AL-TARAZI et al., 2009, JOHLER e STEPHAN, 2010, WALLIN-CARLQUIST et al., 2010).

Os sintomas clássicos da intoxicação alimentar estafilocócica são náuseas, vômitos, câibras abdominais geralmente muito dolorosas, diarreia e sudorese. Podem ocorrer, ainda, dores de cabeça, calafrios, queda de pressão arterial e, em raríssimas vezes, febre, quando a quantidade de toxina ingerida é grande (FRANCO e LANDGRAF, 2008). Varnan e Evans (1991) citam que crianças, idosos e pessoas enfermas são mais susceptíveis à intoxicação estafilocócica, ainda que faixa etária e doença pré-existente não sejam fatores predisponentes à esta doença.

Após a ingestão, as EE apresentam ação emética, através de estímulo do sistema nervoso central, onde se encontra o centro do vômito, provocando o retroperistaltismo. A ação diarreica ocorre através de um mecanismo que não está totalmente elucidado, mas parece estar relacionado ao sistema secretor de sódio e cloro em nível intestinal, provocando desequilíbrio hidro-eletrolítico (FRANCO e LANDGRAF, 2008).

Os sintomas observados pela ingestão de alimentos contendo EE variam com o grau de susceptibilidade do indivíduo, com a concentração de EE presente no alimento e com a quantidade de alimento ingerido (FRANCO e LANDGRAF, 2008). De acordo com Evenson et al. (1988), a dose mínima de EEA requerida para causar doença em crianças em idade escolar é de aproximadamente 144 ± 50 ng, conforme observado num surto ocorrido nos Estados Unidos, após a ingestão de leite achocolatado. No entanto, Franco e Landgraf (2008) descrevem que $0,375 \mu\text{g}$ de enterotoxina por quilo corpóreo seja suficiente para causar a sintomatologia em humanos.

Entre as EE clássicas, EEA é responsável por mais de 75% dos surtos, seguida, em ordem decrescente de frequência, por EED, EEC e EEB (VERNOZYROZAND et al., 2004; JOHLER e STEPHAN, 2010, PINCHUK et al., 2010). De uma maneira geral, o gene da EEA é o mais prevalente em isolados de *Staphylococcus aureus*, no entanto, novas evidências sugerem que essa prevalência pode variar entre distintos países como, por exemplo, na Coreia do Sul, em um estudo conduzido por Kwon et al. (2004), o gene da EEI foi o mais prevalente, seguido pelos genes da EEA e EEH.

Vários casos e surtos já foram reportados na literatura. Como exemplos podem-se citar um grande surto no Japão, ocorrido no ano de 2000, no qual adoeceram, aproximadamente, 14.000 pessoas, com 180 hospitalizações (WHO, 2012). Jorgensen et al. (2005), após um surto de intoxicação alimentar estafilocócica na Noruega, encontraram EEH em um purê de batatas preparado com leite cru. Giezendanner et al. (2009), descreveram um surto ocorrido com crianças na Suíça, após consumo de leite de cabra cru, e detectaram a presença do gene da EED. Ostyn et al. (2010), relataram a primeira evidência de intoxicação alimentar causada pela EEE na França, após ingestão de queijo fabricado com leite não pasteurizado.

No Brasil, existem diversos relatos de intoxicação alimentar estafilocócica: no Estado de Minas Gerais dois surtos foram diagnosticados por Carmo et al. (2002): um deles envolvendo queijo Minas frescal, no qual foi encontrado EEA, EEB e EEC e, no outro, envolvendo leite cru, no qual foram encontradas EEC e EED. Veras et al. (2003), investigaram surtos de intoxicação alimentar envolvendo leite e produtos derivados no estado de Minas Gerais, e constataram que os principais agentes causadores foram *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus coagulase negativa* enterotoxigênicos, e que as principais toxinas envolvidas nos surtos foram EEA, EEB

e EEC. Rodrigues et al. (2004), na cidade de Pelotas, RS, encontraram EEA em sanduíche de galinha após um surto no qual adoeceram 56 pessoas. Em trabalho realizado pelo nosso grupo de pesquisa (dados enviados à publicação) onde foram avaliados 13 isolados de surtos de intoxicação alimentar ocorridos no Rio Grande do Sul, ficou demonstrado que uma ou mais EE clássicas causaram os surtos de intoxicação alimentar nos quais os isolados de *S. aureus* foram obtidos.

É possível afirmar que o Brasil apresenta índices subestimados de intoxicação alimentar estafilocócica. O caráter autolimitante da doença, com uma sintomatologia branda e de curta duração, em média 24 a 48 horas, faz com que os casos e surtos desse tipo de intoxicação raramente levem as pessoas envolvidas a procurarem auxílio médico, de forma que o índice de hospitalização, e consequente notificação, seja relativamente baixo (JORGENSEN et al., 2005; ARGUDÍN, 2010).

O isolamento e determinação da enterotoxigenicidade da cepa de *Staphylococcus* isolada em alimentos indicam o potencial para a produção de enterotoxinas. Além disso, a presença do micro-organismo em altos níveis pode indicar uso inadequado do binômio tempo-temperatura no processamento e/ou armazenamento dos alimentos, condição em que *S. aureus* pode desenvolver-se até níveis suficientes para produzir enterotoxina em concentração capaz de causar doença (BENNETT, 2005). Já a determinação do tipo de EE é um fator importante na investigação epidemiológica de casos e surtos da doença (LANCETTE e BENNETT, 2001), e sua identificação nos alimentos pode indicar a possível fonte de contaminação (NÁJERA-SANCHEZ et al., 2003), tendo em vista que foi demonstrado que EEA e EEB são associadas com contaminação de origem humana, através de manipuladores de alimentos, e que EEC e EED são associadas com contaminação a partir de animais, geralmente bovinos e suínos (HIROOKA et al., 1988; NÁJERA-SANCHEZ et al., 2003; CENCI-GOGA et al., 2003).

Lancette e Bennett (2001) afirmam que o significado da presença de *Staphylococcus aureus* em alimentos deve ser interpretado com cautela, pois uma grande quantidade de micro-organismos não é suficiente para incriminar o alimento como causador de intoxicação alimentar, assim como sua ausência ou presença em pequenas contagens não indica que o alimento não representa perigo do ponto de vista de segurança de alimentos. O potencial risco de intoxicação alimentar estafilocócica somente pode ser determinado após a confirmação da enterotoxigenicidade do micro-organismo isolado e/ou após a demonstração da

presença de enterotoxinas no alimento. No entanto, a legislação brasileira, estabelecida pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) do Ministério da Saúde (MS), através da RDC Nº 12, de 2 de Janeiro de 2001 (BRASIL, 2001), determina limites máximos para presença de estafilococos coagulase positiva em alimentos, considerando os alimentos com altas contagens do micro-organismo como impróprios para o consumo e potencialmente capazes de causar enfermidade. Por outro lado, a pesquisa de EE em alimentos não é estabelecida pela legislação, entretanto, para avaliar um potencial risco da ocorrência de intoxicação alimentar, utiliza-se a pesquisa da enzima coagulase, um teste bioquímico utilizado como marcador de enterotoxigenicidade (VARNAN e EVANS, 1991; LAMPRELL et al., 2004). Isolados de *Staphylococcus* que não produzem coagulase são denominadas “estafilococos coagulase negativa”, e tem uma significativa participação em infecções humanas, particularmente em ambiente hospitalar, em pacientes com defesas imunológicas comprometidas ou portadores de corpos estranhos, tais como próteses, catéteres e enxertos sintéticos. A detecção de genes de EE bem como o envolvimento de estafilococos coagulase negativa em surtos e casos de intoxicação alimentar é bastante reduzido em relação aos casos envolvendo estafilococos coagulase positiva, entretanto, alguns deles são descritos na literatura (CARMO et al., 2002). Segundo Jay (2002), a produção de enterotoxinas geralmente está relacionada com cepas de estafilococos que produzem as enzimas coagulase e termonuclease, embora algumas cepas que não produzem coagulase e/ou termonuclease possam produzir enterotoxinas. Lancette e Bennett (2001) afirmam que existe uma instabilidade fisiológica demonstrada por algumas espécies do gênero *Staphylococcus* em função de fatores genéticos e ambientais, e que estes fatores podem afetar a produção dessas enzimas e das EE.

3.3 Enterotoxina Estafilocócica

As enterotoxinas estafilocócicas (EE) são potentes exotoxinas sintetizadas por espécies de *Staphylococcus* durante a fase logarítmica de crescimento ou durante a transição da fase exponencial para a fase estacionária, contudo, estima-se que sejam necessárias entre 10^5 e 10^6 unidades formadoras de colônias (UFC) da bactéria por grama de alimento para que a toxina seja formada em níveis capazes de provocar intoxicação alimentar (FRANCO e LANDGRAF, 2008). Possuem massa

molecular variando entre 25.000 a 30.000 daltons, solúveis em água e em soluções salinas, que apresentam estrutura primária, estrutura molecular e atividades farmacológicas semelhantes entre si, possuindo, entretanto, propriedades imunológicas distintas (LEBEAU et al., 1994; NOVAK, 1999; BALABAN e RASOOLY, 2000). Determinadas condições ambientais que facilmente destroem o micro-organismo produtor destas enterotoxinas, não destroem a EE (FRANCO e LANDGRAFF, 2008). As EE são resistentes às enzimas proteolíticas, mantendo, portanto, a sua atividade no trato digestivo após a ingestão. Apenas a EEB é inativada pela pepsina em pH próximo de 2.0 (SANTANA et al., 2010).

As enterotoxinas ainda são termorresistentes, o que aumenta sua importância na indústria de alimentos, uma vez que, a maioria dos alimentos recebe tratamento térmico (ASPERGER, 1994; BERGDOLL e WONG, 2006; FRANCO e LANDGRAF, 2008). O grau de resistência das enterotoxinas depende de vários fatores como o tipo de enterotoxina, pH e o meio. As EEs quando purificadas tornam-se mais termossensíveis que as não purificadas, enquanto que a inativação por tratamento térmico é mais rápida em soluções tampão do que em meios de cultura e alimentos (BERGDOLL e WONG, 2006). A produção de enterotoxinas é influenciada pela temperatura, pH, atividade de água (Aa), fonte de carbono e nitrogênio, concentração de sal e condições atmosféricas do substrato. Em temperaturas ótimas, a enterotoxina torna-se detectável entre 4 a 6 horas (BERGDOLL e WONG, 2006; FRANCO e LANDGRAF, 2008).

A manutenção em baixas temperaturas pode ser usada no controle da produção de enterotoxinas em alimentos, pois a multiplicação bacteriana diminui e a síntese de enterotoxinas é quase totalmente inibida em temperaturas inferiores a 7°C (ASPERGER, 1994). Segundo Bergdoll, 1983 (apud LOIR et al., 2003), as enterotoxinas são mais termorresistentes em alimentos do que em meios de cultura, podendo ser inativadas através do tratamento térmico como a esterilização no caso de alimentos enlatados, quando em baixas concentrações. Segundo FDA (U.S. Food and Drug Administration, 2001), a toxina estafilocócica é sensível entre 98,9°C por 68,5min e 126,7°C por 6,2min. A produção de EE é ideal em pH neutro, sendo o pH ácido desfavorável, ocorrendo a inibição de síntese de enterotoxinas em pH menor que 5.0. Por outro lado, pH alcalinos levam a diminuição da síntese de EEB, EEC e EED (LOIR et al., 2003).

As enterotoxinas A e D são produzidas em condições amplas de pH, Aa e potencial de oxi-redução (Eh), diferentes da EEB e EEC que, quando em condições de pH abaixo do ideal, são produzidas em menor quantidade (ZOLI et al., 2002; BERGDOLL e WONG, 2006). Sabe-se que em meio de cultura as enterotoxinas B e C são produzidas em maiores quantidades ($> 100\mu\text{g.mL}^{-1}$) do que outras como a EEE e EED, sendo a EEH normalmente produzida em quantidades menores que $1\mu\text{g.mL}^{-1}$ (BERGDOLL e WONG, 2006).

Vinte e duas EE foram descritas, sendo que as EE clássicas (EEA, EEB, EEC, EED e EEE) são as mais estudadas e responsáveis por, aproximadamente, 95% dos casos/surtos (AL-TARAZI et al., 2009, JOHLER e STEPHAN, 2010, WALLIN-CARLQUIST et al., 2010).

Em função do crescente relato de novas EE, e buscando uma padronização da nomenclatura, o Comitê Internacional para Nomenclatura de Superantígenos Estafilocócicos (INCSS) recomendou que apenas superantígenos estafilocócicos que induzam emese em macacos sejam designados enterotoxinas estafilocócicas, enquanto que as recentes enterotoxinas descritas, cujas propriedades eméticas ainda não estão totalmente esclarecidas, sejam designadas apenas como “similares”, ou pelo termo original em inglês, “like”, acrescentando-se à sua sigla a letra “I”, até a elucidação do exato mecanismo celular e molecular envolvido em sua patogênese (LINA et al., 2004).

Na Tabela 1 são apresentadas as EE e as EEI descritas na literatura.

Tabela 1: Enterotoxinas produzidas por *Staphylococcus aureus*.

ENTEROTOXINA	SIGLA	REFERÊNCIA
A	EEA	CASMAN, (1960)
B	EEB	BERGDOLL et al., (1959)
C1	EEC ₁	BERGDOLL et al., (1965)
C2	EEC ₂	AVENA e BERGDOLL, (1967)
C3	EEC ₃	REISER et al., (1984)
D	EED	CASMAN et al., (1967)
E	EEE	BERGDOLL et al., (1971)
G	EEG	MUNSON et al., (1998)
H	EEH	SU e WONG, (1995)
I	EEI	MUNSON et al., (1998)
J	EEIJ	ZHANG et al., (1998)
K	EEIK	ORWIN et al., 2001
L	EEIL	FITZGERALD et al., (2001)
M	EEIM	JARRAUD et al., (2001)
N	EEIN	JARRAUD et al., (2001)
O	EEIO	JARRAUD et al., (2001)
P	EEIP	KURODA et al., 2001
Q	EEIQ	ORWIN et al., (2002)
R	EEIR	OMOE et al., (2003)
U	EEIU	LETERTRE et al., (2003c)
U2	EEIU2	THOMAS et al., (2006)
V	EEIV	THOMAS et al., (2006)

Em 1981, Bergdoll e colaboradores identificaram uma toxina produzida por *Staphylococcus aureus*, causadora de síndrome do choque tóxico, a qual, pela ordem de descobrimento portaria a sigla “EEF”. No entanto, essa toxina foi renomeada com a sigla TSST-1 devido à ausência de atividade emética em macacos (SU e WONG, 1997; FUEYO et al., 2005), o que, conforme descrito acima, é uma evidência absolutamente necessária para a caracterização da enterotoxina.

As EE possuem uma estreita identidade genética entre si, sendo sua relação filogenética estimada pela análise da sequência de nucleotídeos de seus respectivos genes. A sequência nucleotídica divergente, bem como diferenças nas sequências de aminoácidos, permitiu dividi-las, de maneira hierárquica, em dois grandes grupos. O primeiro grupo é formado por EEA, EED e EEE, as quais apresentam similaridade de sequência na sua cadeia de aminoácidos variando entre 51 e 81%. O segundo grupo compreende EEB e os subtipos de EEC, com uma sequência similar de 42 a 67% (BALABAN e RASOOLY, 2000).

Uma das formas de organização dos genes das enterotoxinas estafilocócicas é denominada ilha de patogenicidade (SaPI), que são classificadas como elementos

genéticos acessórios que possuem tamanho entre 15 e 20 kb, e que ocupam posições específicas no cromossomo de cepas toxigênicas. Inicialmente foram descritas cinco ilhas de patogenicidade em *S. aureus*: SaPI 1, SaPI 2, SaPI 3, SaPI 4 e SaPI_{bov} (NOVICK et al., 2001), as quais portavam genes para fatores de virulência do micro-organismo. Sabe-se, por exemplo, que SaPI 1 possui os genes das EEIK e EEIL, SaPI 3 o gene das EEB, EEIK e EEIQ (YARWOOD et al., 2002) e SaPI 4 o gene da EEC EEIK, EEIL e EEIM (NOVICK, 2003). Em um estudo conduzido por Fitzgerald et al. (2001), uma análise genético-molecular permitiu a identificação de uma ilha de patogenicidade em *Staphylococcus aureus* isolados de bovinos, denominada SaPI_{bov}, onde se encontravam os genes codificadores de TSST, EEC-bov e EEIL.

Os genes codificadores de EE, assim como outros que codificam fatores de virulência de *Staphylococcus*, também podem estar dispostos em elementos genéticos móveis, tais quais os plasmídeos, os bacteriófagos e os elementos genéticos transponíveis (NOVICK et al., 2001; YARWOOD et al., 2002). Sabe-se que EEA e EED, por exemplo, as duas enterotoxinas com a maior frequência de envolvimento em intoxicação alimentar estafilocócica, são codificadas por genes localizados em bacteriófago (BETLEY e MEKALANOS (1985) apud NOVICK, 2003) e plasmídeo (BAYLES e IANDOLO (1989) apud ZHANG et al., 1998; NOVICK, 2003), respectivamente. A presença de genes para fatores de virulência em elementos genéticos móveis numa cepa de *Staphylococcus aureus*, como, por exemplo, algum gene que codifique resistência a um antibiótico ou uma enterotoxina, implica em sua possível mobilidade de uma molécula de DNA para outra, ou de uma bactéria para outra, num processo conhecido como transferência horizontal de genes, conferindo uma vantagem seletiva e evolutiva ao micro-organismo receptor (FERREIRA, 2001; YARWOOD et al., 2002).

As EE são descritas como proteínas acessórias, ou seja, não são utilizadas para o crescimento e multiplicação do micro-organismo. Além disso, são denominadas superantígenos por possuírem atividade superantigênica, ou seja, possuem a capacidade de estimular os linfócitos T auxiliares de forma não específica através da molécula do complexo principal de histocompatibilidade da classe II (MHC II) das células apresentadoras de antígenos (Figura 1). Dessa forma, essa união ocorre de uma maneira indiscriminada e em grande abundância,

podendo originar uma variedade de sintomas, como febre, náuseas, vômitos e até mesmo choque (TRABULSI et al., 2004).

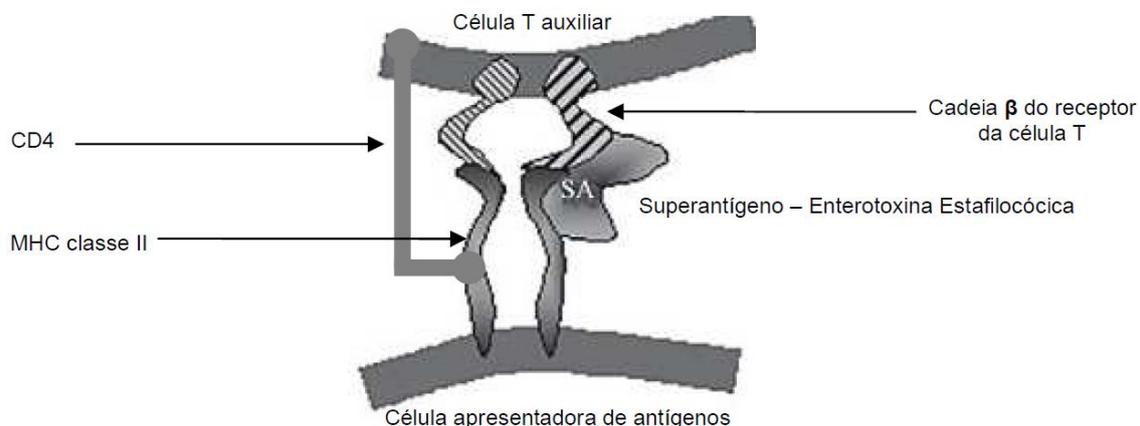


Figura 1: Representação da ativação não específica de células T através de enterotoxinas estafilocócicas.

FONTE: Adaptado de LOIR et al. (2003).

Sabe-se que a quantidade de EE requerida para ativação de células T é muito menor que a requerida para uma resposta de um antígeno convencional, no entanto, a quantidade de citocinas produzida é significativamente maior numa resposta à EE. Embora náuseas e vômitos exibidos em intoxicação alimentar estafilocócica sejam atribuídos à grande quantidade de interleucina liberada como consequência da elevada ativação de células T, o completo mecanismo molecular que induz a emese não está totalmente elucidado. Sabe-se, no entanto, que a severidade da intoxicação alimentar estafilocócica depende da enterotoxina envolvida assim como da quantidade de EE ingerida com o alimento (BETLEY e HARRIS, 1994; BALABAN e RASOOLY, 2000; PROFT e FRASER, 2003). Como exemplo, pode ser citada a intoxicação causada pela EEB, onde menores quantidades desta toxina exibem sintomas mais severos do que a causada pela EEA.

A via de absorção da EE está também relacionada com a severidade da doença. Estima-se que, via gastrointestinal, é necessário uma quantidade de 0,375µg de enterotoxina por quilo corpóreo para causar sintomatologia clássica de intoxicação alimentar em humanos (FRANCO e LANDGRAF, 2008). Ulrich et al. (1997), afirmam que, em humanos, quando as EE são administradas por via intranasal, a dose aproximada de 0,0004µg por quilo corpóreo, seria suficiente para gerar

sintomas como febre, mialgia, dispnéia, náuseas, anorexia e vômitos. Estes mesmos autores estimaram que a dose letal em humanos, quando a EE é administrada por via inalatória, seria apenas 0,02 μ g por quilo corpóreo. O potencial da doença causada por EE, principalmente EEB, quando administrada por via intra-nasal, foi extensivamente estudada nos Estados Unidos na década de 1960, sendo cogitada, na época, como um potencial agente biológico a ser utilizado em programas bélicos (ULRICH et al., 1997).

Embora uma mesma cepa de *S. aureus* possa albergar diversos genes de EE, a secreção destas proteínas é cepa-específica e varia de acordo com os fatores intrínsecos e extrínsecos do substrato em que micro-organismo esteja inserido. Como exemplos, podem ser citados meios de cultura contendo glicose ou NaCl, os quais, em determinadas concentrações, reprimem a transcrição do RNA que conduz a informação para codificação de EEA e EEC e de EEB e EEC, respectivamente (WESELL, 2000; HENNEKINNE et al., 2012 e PAULIN et al., (2012). Com relação a outros fatores, Su e Wong (1998), verificaram que, em condições de laboratório, *S. aureus* produz grandes quantidades de EEH quando incubado em condições aeróbicas e sob um pH 7,0, no entanto, quando incubado em pH 6,5 e/ou 7,5, as quantidades de EEH detectadas foram significativamente menores.

A regulação dos fatores de virulência como as EE, é crítica para a patogenicidade dos micro-organismos. Em *S. aureus*, diversos reguladores globais têm sido citados, como é o caso do gene regulador acessório (*agr*) (TSENG et al., 2004). O sistema *agr* regula a produção de algumas EE, como as EEB, EEC e EED, no entanto, EEA é expressa constitutivamente e, até o momento, não há dados de mecanismos de regulação controlando a produção desta toxina (JOHLER e STEPHAN et al., 2010).

3.4 PCR em tempo real (qPCR)

A PCR em tempo real, também conhecida como PCR quantitativa (qPCR), foi descrita pela primeira vez em 1993, por Higuchi e colaboradores, que montaram um sistema ao qual acoplaram uma câmara de vídeo, de modo a monitorizar a PCR durante todos os ciclos. Este mecanismo permitiu-lhes detectar o aumento da fluorescência durante a reação, devido à ligação do brometo de etídio às moléculas de DNA dupla fita recém-sintetizadas.

O procedimento é semelhante ao da técnica da PCR convencional diferindo essencialmente numa característica inovadora: a possibilidade de quantificação em tempo real do DNA amplificado, em cada ciclo de amplificação de maneira precisa e com maior reprodutibilidade, porque determina valores durante a fase exponencial da reação (NOVAIS et al., 2004). Neste método, as fases de amplificação, detecção e quantificação são totalmente automatizadas, ocorrendo em simultâneo e em tempo real (HEID et al., 1996). Na última década diversas plataformas de instrumentação foram criadas e comercializadas, no entanto, a maioria é composta por um termociclador, com sistema óptico para a excitação e recolha da emissão da fluorescência e um computador com software próprio para a aquisição de dados e análise final da reação (MACKAY et al., 2007).

O ponto que detecta o ciclo na qual a reação atinge o limiar da fase exponencial é denominado de *Cycle Threshold* (C_T) (Fig. 2). Este ponto permite a quantificação exata e reprodutível baseado na fluorescência.

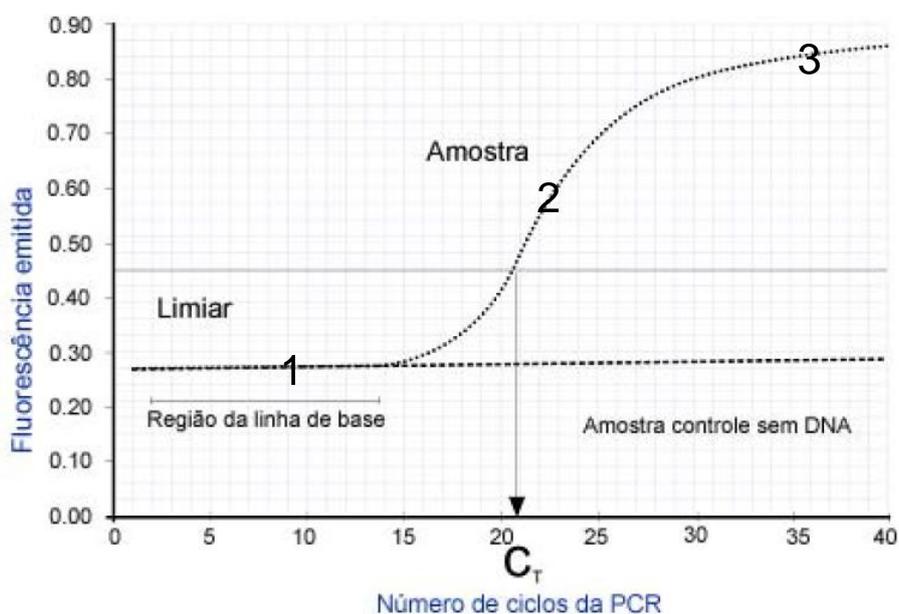


Figura 2: Curva de amplificação da PCR em tempo real.
Fonte: Adaptado de NOVAIS et al. (2004).

A amplificação mostra 3 fases distintas (1) linha basal: não houve produtos da PCR suficiente para detectar a fluorescência; (2) fase log: a quantidade de produtos da PCR dobra a cada ciclo e (3) fase platô: não há mais aumento no número de produtos (NOVAIS et al., 2004).

A emissão dos compostos fluorescentes gera um sinal que aumenta na proporção direta da quantidade de produto da PCR. Sendo assim, os valores da fluorescência são gravados durante cada ciclo e representam a quantidade de produto amplificado. A fase de crescimento exponencial é considerada a melhor para se estudar a reação devido à elevada eficiência registrada, uma vez que a relação entre a quantidade de produto e do input de DNA é mais consistente. Por este motivo os dados de fluorescência são geralmente recolhidos desde o início do processo de amplificação (NOVAIS et al., 2004).

A interpretação dos resultados obtidos pelos equipamentos obriga que se definam conceitos específicos, como baseline, Ct e threshold. A baseline corresponde ao limiar mínimo de detecção de fluorescência do instrumento sendo considerado “ruído de fundo” do equipamento. O Ct corresponde ao número de ciclos necessários para que a fluorescência da reação seja detectável. Trata-se de um ponto a partir do qual a fluorescência detectada ultrapassa o limiar da fase exponencial, conhecido também na literatura como threshold, definido automática e arbitrariamente pelo software do equipamento em função da baseline. O valor mínimo de Ct é dependente da quantidade de moléculas presente no início do processo de amplificação, o que significa que um menor número de moléculas inicialmente representa um maior número de ciclos requeridos para gerar um aumento exponencial do sinal da fluorescência que seja significativamente superior à baseline (HEID et al., 1996; KUBISTA et al., 2006; PELT-VERKUIL et al., 2008).

A análise in vitro dos produtos da amplificação por PCR em tempo real é concretizada através da utilização de compostos fluorescentes. Os métodos químicos de fluorescência utilizados na PCR em tempo real são hoje em dia diversificados, recorrendo todos eles a um composto fluorescente que absorve e emite luz em um comprimento de onda específico e este sinal é detectado pelo termociclador, permitindo o acompanhamento da reação ao longo dos ciclos. De acordo com a literatura, estes métodos podem ser agrupados em dois grandes grupos de acordo com o tipo do composto fluorescente e respectivo comportamento durante o processo. Serão considerados os seguintes grupos de compostos: corantes intercalantes e sondas de sequência específica (MACKAY et al., 2007; PELT-VERKUIL et al., 2008).

Os corantes intercalantes são fluorocromos sem especificidade para uma sequência particular de DNA, que se intercalam na dupla cadeia de qualquer produto

da PCR permitindo a sua detecção. Contudo o correto desenho dos oligonucleotídeos confere elevada especificidade da detecção e quantificação a estes métodos. Neste domínio, a primeira tecnologia desenvolvida foi patenteada pela Molecular Probes®, Inc, em 1990, sendo denominada de SYBR® Green. Recentemente foram desenvolvidas novas moléculas: a LCGreen® Plus (Idaho Technology) e a EvaGreen® (Biotium Inc) (WITTEWER et al., 2003; IHRIG e MÜHLENHOFF, 2006; HERRMANN et al., 2007;).

A tecnologia SYBR® Green baseia-se num conjunto de moléculas com a capacidade de se ligar de forma covalente à dupla cadeia de DNA e quando excitadas emitem uma fluorescência verde que é medida e convertida numa quantidade de DNA (Fig. 3).

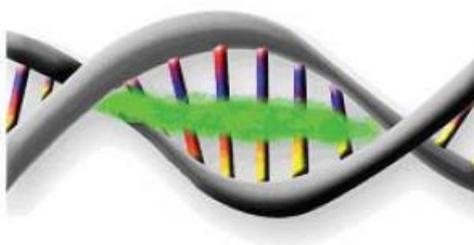


Figura 3: Molécula de SYBR® Green entre a fita dupla de DNA.
Fonte: Adaptado de NOVAIS et al. (2004).

No começo da amplificação, a mistura da reação contém o DNA desnaturado, os iniciadores e o SYBR® Green. As moléculas não-ligadas do SYBR® Green apresentam fluorescência fraca produzindo um sinal mínimo, sendo este subtraído durante a análise de computador. Após o reconhecimento dos iniciadores, algumas moléculas de SYBR® Green podem ligar-se na fita dupla previamente formada. Durante a polimerização catalisada pela enzima *Taq* DNA polimerase, as moléculas do SYBR® Green vão se ligando ao DNA recentemente sintetizado. Assim, a reação é monitorada continuamente e um aumento da fluorescência é observado em tempo real. No ciclo seguinte, na etapa de desnaturação do DNA, as moléculas do SYBR® Green são liberadas e há queda no sinal da fluorescência. A detecção da fluorescência no fim da etapa de extensão de cada ciclo da PCR permite monitorar a quantidade crescente de DNA amplificado (VITZTHUM et al., 1999).

As vantagens da utilização do SYBR® Green são: baixo custo, facilidade no uso e sensibilidade. A desvantagem é a ligação em todo o DNA fita dupla que surge durante a reação, incluindo os dímeros dos iniciadores e outros produtos

inespecíficos, podendo superestimar a concentração do fragmento alvo. O SYBR® Green não ligado ao DNA exibe uma fluorescência muito pequena, entretanto, a fluorescência é realçada quando ligado na dupla fita do DNA (MACKAY et al., 2007; OLIVEIRA, 2009).

As sondas de sequência específica, lineares ou em alça, são oligonucleótidos que requerem um fluorocromo que é adicionado a uma sonda com especificidade para uma dada sequência de DNA e que detectam exclusivamente a dada sequência em todos os produtos da PCR. As duas alternativas mais utilizadas são TaqMan® e Molecular Beacons, ambos com capacidade de hibridização gerando transferência de energia para quantificação (NOVAIS et al., 2004).

Após a detecção e amplificação do DNA é necessário quantificá-lo. A técnica da PCR em tempo real permite que a quantificação do DNA possa ser realizada de forma absoluta ou relativa. Assim, recorre-se frequentemente a dois métodos para quantificar os resultados da PCR em tempo real: o método da curva padrão e método da comparação do limiar da fase exponencial (MA et al., 2006; PELT-VERKUIL et al., 2008).

Na quantificação absoluta determina-se o número exato de moléculas (número de cópias de DNA ou nanogramas de DNA). Trata-se de um método de determinação da concentração inicial de uma dada amostra de concentração desconhecida a partir de uma curva padrão, obtida após diversas análises precisas e consistentes em amostras de concentração conhecida. Para tal, o valor de Ct (de uma dada amostra de concentração desconhecida) é projetado num gráfico Ct em função do logaritmo da concentração de DNA, onde está representada a curva padrão, e a partir da qual se extrapola a concentração de DNA da amostra em questão. Existem outros métodos para a quantificação absoluta, como por exemplo métodos que recorrem a derivadas secundárias (MA et al., 2006; PELT-VERKUIL et al., 2008).

O método mais utilizado para quantificação relativa é o da comparação do limiar da fase exponencial (threshold), sem recurso a curvas padrão. Este método consiste na comparação dos valores Ct das amostras com um controle. Os valores de Ct de ambos (amostra e controle) são normalizados a um gene endógeno apropriado. O método comparativo Ct também é conhecido como o método $2^{-\Delta\Delta CT}$, onde $\Delta\Delta CT = \Delta CT_{amostra} - \Delta CT_{referência}$. Nesta equação $\Delta CT_{amostra}$ é o valor de Ct para qualquer amostra normalizada (ao gene apropriado) e $\Delta CT_{referência}$ é o

valor de Ct para o controle normalizado (ao gene apropriado). Para que o cálculo de $\Delta\Delta CT$ seja válido, a eficiência da amplificação da amostra alvo e da referência endógena deve ser aproximadamente igual (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001; MA et al., 2006; PELT-VERKUIL et al., 2008). A quantificação relativa é aplicável na quantificação da expressão gênica (quando esta é medida em valores múltiplos de expressão) (SABEK et al., 2002) e, devido à precisão e sensibilidade do qPCR, mesmo mudanças muito sutis na expressão do gene podem ser detectadas, sendo uma valiosa ferramenta no controle da expressão de genes sob diferentes condições de crescimento (VALASEK e REPA, 2005; JOHLER e STEPHAN, 2010).

A técnica de PCR em tempo real apresenta como principais vantagens: simplicidade, especificidade, elevada sensibilidade no que se refere à utilização de uma sonda ou de um corante apropriado, rapidez, redução do risco de contaminação pós amplificação, elevado potencial de produção, introdução contínua de novos químicos, detecção de quantidades relativamente pequenas de DNA alvo (3 picogramas de material, o que é cerca de 1000 vezes menos material genético) e facilidade de quantificação. Uma melhoria nos protocolos tem feito com que a tecnologia de PCR em tempo real seja a tecnologia de referência para a detecção de DNA (WATZINGER et al., 2004).

Em contrapartida apresenta algumas desvantagens, nomeadamente, o fato de não ser ideal para multiplex, a sua utilização requer uma elevada competência profissional e assistência técnica muito especializada e finalmente é uma tecnologia com um custo inicial muito elevado devido ao preço do equipamento, o que impede que muitos laboratórios estejam equipados com esta tecnologia. Nesta técnica recorre-se frequentemente a corantes interligantes, que têm a desvantagem de se ligar a qualquer outro produto da dupla cadeia, incluindo dímeros de *primers* e outros produtos de amplificação não específicos, originando assim emissão de fluorescência que pode não corresponder ao DNA alvo (ALONSO, 2008). Outra desvantagem deve-se à incompatibilidade da técnica com alguns químicos que emitem fluorescência (WATZINGER et al., 2004).

4 Artigo 1: Prevalência e expressão de genes de enterotoxinas estafilocócicas clássicas de *S. aureus* isolados de surtos de intoxicação alimentar no Rio Grande do Sul, Brasil.

Prevalência e expressão de genes de enterotoxinas estafilocócicas clássicas de *S. aureus* isolados de surtos de intoxicação alimentar no Rio Grande do Sul, Brasil.

BASTOS, Caroline Peixoto¹; BASSANI, Milena Tomasi²; SILVA, Wladimir Padilha da³

Resumo

Staphylococcus aureus é um importante patógeno de origem alimentar e produz uma variedade de toxinas, dentre elas as enterotoxinas estafilocócicas (EE), as quais causam a intoxicação alimentar estafilocócica. Diversos trabalhos têm focado na avaliação da presença dos genes das enterotoxinas, entretanto, poucos estudos avaliaram a expressão destas toxinas. Sendo assim, este trabalho teve por objetivo avaliar a prevalência e expressão dos genes das enterotoxinas clássicas (EEA, EEB, EEC, EED e EEE) em isolados de *S. aureus* provenientes de diferentes surtos de intoxicação estafilocócica ocorridos entre 2002 e 2004 no estado do Rio Grande do Sul, Brasil, com base na análise do mRNA, verificando se há relação entre a presença de determinado gene de EE, seus níveis de expressão transcricional e o provável envolvimento no surto. Foram utilizados 13 isolados de *S. aureus*, provenientes de 13 diferentes surtos de intoxicação alimentar ocorridos no estado do Rio Grande do Sul, Brasil, e a expressão relativa dos genes das enterotoxinas clássicas foi analisada por PCR em tempo real (qPCR). Todos os isolados, com exceção de dois, apresentaram expressão transcricional igual ou maior que a da cepa padrão, para pelo menos um dos genes das enterotoxinas clássicas. Além disso, observou-se que quatro isolados expressaram genes de uma enterotoxina, enquanto os demais apresentaram expressão dos genes de, no mínimo, duas enterotoxinas. Embora não se tenha informação a respeito de qual enterotoxina causou a intoxicação alimentar nos surtos avaliados, a prevalência das EE clássicas,

¹Química de Alimentos, M. Sc., Doutoranda do Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos - Laboratório de Microbiologia de Alimentos – DCTA - FAEM – UFPel. campus universitário s/n – caixa postal 354 – 96010000 – Pelotas – RS, Brasil. Telefone: 55(53)32757258 ramal 202. Email: carolpebastos@yahoo.com.br

²Médica Veterinária, M.Sc., Doutoranda do Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos – Laboratório de Microbiologia de Alimentos – DCTA - FAEM – UFPel. campus universitário s/n – caixa postal 354 – 96010000 – Pelotas – RS, Brasil. Telefone: 55(53)32757258 ramal 202. Email: mtbassani@yahoo.com.br

³Médico Veterinário, Professor, Dr, Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos – Laboratório de Microbiologia de Alimentos - DCTA - FAEM – UFPel. campus universitário s/n – caixa postal 354 – 96010000 – Pelotas – RS, Brasil. Telefone: 55(53)32757258 ramal 203. Email: silvawp@ufpel.edu.br

associada aos elevados níveis de expressão transcricional encontrados, demonstram que uma ou mais EE clássicas causaram os surtos de intoxicação alimentar nos quais os isolados de *S. aureus* foram obtidos.

Palavras-chave: Enterotoxina estafilocócica clássica. Intoxicação alimentar. *Staphylococcus aureus*. Expressão gênica. qPCR.

Abstract

Staphylococcus aureus is important pathogen of food origin and produce a variety of toxins, among them staphylococcal enterotoxins (SE) which cause Staphylococcal food poisoning. Several studies were focused on the evaluation of the presence of genes of enterotoxins. Nevertheless, a few studies have evaluated the expressions of these toxins. Thus, this study aimed at evaluating the prevalence and expression of genes of classic enterotoxins (SEA, SEB, SEC, SED e SEE) in isolated of *S. aureus* derived from different staphylococcal food poisoning outbreaks which were isolated between 2002 and 2004 in the state of Rio Grande do Sul, Brazil, based on the mRNA analysis, verifying if there is a relation between the presence of a specific SE gene, its levels of transcriptional expression and the probable involvement in the outbreak. It has been used 13 isolated *S. aureus*, derived from 13 different food poisoning outbreaks in the state of Rio Grande do Sul, Brazil, and the expression related of genes of classic enterotoxins were analyzed by real time PCR (qPCR). All isolated, with exception two have shown transcriptional expression equal or bigger than standard strain for at least one of the genes of classic enterotoxins. Moreover, it has been observed that four isolates have expressed genes of one enterotoxin, while the others have shown expressions of at least two enterotoxins genes. Although there is no information related to which enterotoxin has caused the food poisoning in the evaluated outbreaks, the prevalence of classic SE, along with high levels of transcriptional expression showed that one or more classic SE caused of food poisoning outbreaks in which the isolated of *S. aureus* were obtained.

Keywords: Classic staphylococcal enterotoxins. Food poisoning. *Staphylococcus aureus*. Gene expression. qPCR.

4.1 Introdução

S. aureus é um dos agentes etiológicos mais comuns de doenças bacterianas em todo o mundo devido à sua capacidade de produzir uma ampla gama de exotoxinas e outros fatores de virulência (FUSCO et al., 2011). Entre elas, as enterotoxinas estafilocócicas (EE), produzidas por algumas cepas de *S. aureus*, causam uma das doenças mais comuns transmitidas por alimentos, a intoxicação alimentar estafilocócica (BALABAN e RASOOLY, 2000). Essa intoxicação é resultante do consumo de alimentos ou bebidas contendo a dose infectante de uma ou mais EE pré-formadas no alimento (LETERTRE, 2003). Outro aspecto de grande importância é a termoestabilidade das EE, tendo em vista que o tratamento térmico destrói o patógeno, mas não a toxina (BALABAN E RASSOLY, 2000; DINGES et al., 2000). Isto pressupõe que as atividades biológicas das EE permanecem inalteradas, mesmo após o tratamento térmico usual dos alimentos, possibilitando a ocorrência da doença (HOLECKOVÁ et al., 2002). Até o momento, a literatura descreve 22 tipos de EE, sendo que as mais estudadas estão divididas em cinco grandes grupos sorológicos, com base em suas propriedades antigênicas, chamadas de EE clássicas (EEA, EEB, EEC, EED e EEE), as quais são responsáveis por, aproximadamente, 95% dos surtos de intoxicação alimentar estafilocócica (LETERTRE et al., 2003, AL-TARAZI et al., 2009, JOHLER e STEPHAN, 2010). Os sintomas da intoxicação alimentar estafilocócica surgem, geralmente, em 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 (JORGENSEN et al., 2005, ARGUDÍN, 2010). Estima-se que seja necessário 1µg de EE para causar intoxicação alimentar, mas as quantidades são variáveis entre indivíduos e dependem da quantidade de alimento contaminado ingerido, do tipo de enterotoxina, do peso e do estado imunológico do indivíduo (FREIRAS et al., 2004). Com relação a quantidade de micro-organismo, Franco e Landgraaf (2002) relatam que 10^5 a 10^6 UFC (Unidades Formadoras de Colônias) de *S. aureus* por grama de alimento, sejam necessárias para produzir a toxina e causar a doença. Diversos surtos de intoxicação alimentar causados por *S. aureus* já foram descritos na literatura (CARMO et al., 2002, IKEDA et al., 2005, JORGENSEN et al.,

2005, GIEZENDANNER et al., 2009, SCHIMID et al., 2009, OSTYN et al., 2010) e os alimentos mais envolvidos são: leites e derivados, carnes e derivados, aves, ovos, saladas e produtos de panificação (TAMARAPU, et al., 2001, IKEDA et al., 2005, JORGENSEN et al., 2005, SCHIMID et al., 2009). Muitos estudos têm avaliado a presença de genes das EE em *S. aureus* isolados de alimentos provenientes ou não de surtos (RALL et al., 2008, BENDAHOU et al., 2009, GIEZENDANNER et al., 2009), entretanto, poucos têm focado na análise de sua expressão. A técnica de PCR em tempo real (qPCR) é um dos métodos quantitativos mais sensíveis e confiáveis para análise de expressão gênica, permitindo detectar e quantificar quantidades muito pequenas de sequências específicas de ácidos nucleicos (VALASEK e REPA, 2005, YUAN et al., 2006). O objetivo deste trabalho foi avaliar a prevalência e expressão dos genes das enterotoxinas clássicas em isolados de *S. aureus* provenientes de diferentes surtos de intoxicação estafilocócica ocorridos entre 2002 e 2004 no estado do Rio Grande do Sul, Brasil, com base na análise do mRNA, verificando se há relação entre a presença de determinado gene de EE, seus níveis de expressão transcricional e o provável envolvimento no surto.

4.2 Material e métodos

4.2.1 Confirmação da identidade de *S. aureus*, extração de DNA e amplificação dos genes das enterotoxinas clássicas por PCR

Foram utilizados 13 isolados de *S. aureus* (identificados como C01 para o isolado 1, C02 para o isolado 2 e assim sucessivamente até o isolado 13), provenientes de 13 diferentes surtos de intoxicação alimentar estafilocócica ocorridos no estado do Rio Grande do Sul, Brasil, fornecidos pelo Laboratório Central de Saúde Pública do Rio Grande do Sul (LACEN-RS) e cepas de referência de *S. aureus*, FRI S6, carreadora dos genes *eea* e *eeb*, FRI 361 carreadora dos genes *eec* e *eed*, e FRI 326 carreadora do gene *eee*, pertencentes ao Banco de Cepas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos do DCTA/FAEM, da Universidade Federal de Pelotas (UFPel). Todos os isolados e as cepas padrão foram previamente purificados em ágar Baird Parker (ABP, Oxoid®), identificados bioquimicamente através da avaliação da resistência à acriflavina, produção de catalase e de coagulase livre, conforme descrito por Brito et al. (2002) e Gandra et

al. (2005), e mantidos em ágar Conservação, até o momento do uso. Para a identificação molecular de *S. aureus* foi utilizada uma multiplex PCR (mPCR) onde os genes alvo foram *nuc* (sequência específica para o gene da termonuclease de *S. aureus*) e 16S rRNA (controle de amplificação interno - IAC). A amplificação das enterotoxinas clássicas foram realizadas PCR, tendo como alvo os genes *eea*, *eeb*, *eec*, *eed* e *eee* (Tab. 1).

Tabela 1 -Oligonucleotídeos utilizados para identificação de *S. aureus* e das enterotoxinas clássicas.

Oligonucleotídeos	Sequência 5´- 3´	Produto de amplificação (pb)	Alvo	Referência
NUC1	ATGAAGTCAAATAAATCGCT	458	<i>nuc</i>	Baron et al. (2004)
NUC2	TTTGGTGAAAAATACTTCTC			
EEA1	ACGATCAATTTTTACAGC	544	<i>eea</i>	Rosec e Gigaud (2002)
EEA2	TGCATGTTTTTCAGAGTTAATC			
EEB1	ATTCTATTAAGGACACTAAGTTAGGGGA	404	<i>eeb</i>	Jarraud et al. (2002)
EEB2	ATCCCGTTTCATAAGGCGAGT			
EEC1	GTAAAGTTACAGGTGGCAAACCTTG	297	<i>eec</i>	Jarraud et al. (2002)
EEC2	CATATCATACCAAAAAGTATTGCCGT			
EED1	CAAAATATATTGATATAATGA	330	<i>eed</i>	Zocche et al. (2009)
EED2	AGTAAAAAAGAGTAATGCAA			
EEE1	CAAAGAAATGCTTTAAGCAATCTTAGGC	482	<i>eee</i>	Jarraud et al. (2002)
EEE2	CACCTTACCGCCAAAGCTG			
16S1	GGACGGGTGAGTAACACGTGG	252	16S rRNA	Baron et al. (2004)
16S2	TCCCGTAGGAGTCTGGACCGT			

Para extração de DNA, as células bacterianas foram inoculadas em ágar Tripticase de Soja (TSA, Merck®) e incubadas a 37°C por 24 horas. Após esse período, o DNA genômico foi extraído de acordo com protocolo proposto por Matthews et al. (1997). A qualidade e a quantidade de DNA extraídos foram estimadas por eletroforese em gel de agarose 1%, comparando-se com o padrão de massa molecular DNA/HindIII (Invitrogen®).

Os produtos de amplificação das PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1,2%, corados com brometo de etídeo, e visualizados sob iluminação ultravioleta, sendo comparados com o marcador de massa molecular 100pb DNA Ladder (Invitrogen®).

4.2.2 Extração de RNA e síntese de cDNA

Para extração do RNA total, as células bacterianas foram inoculadas em ágar TSA e incubadas a 37°C. Após 24 horas, uma colônia isolada foi retirada do TSA,

inoculada em caldo Brain Heart Infusion (BHI, Merck®) e incubada a 37°C por 24 horas. Posteriormente, o RNA foi extraído e purificado com o RiboPure™-Bacteria Kit (Ambion®), de acordo com o protocolo fornecido pelo Kit. A qualidade dos RNAs foi verificada em gel de agarose a 1,5% (m/v). A síntese de cDNA foi realizada com o High Capacity Cdna Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems®), de acordo com as instruções do fabricante.

4.2.3 PCR em tempo real (qPCR)

A avaliação por qPCR foi realizada em termociclador 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems™). A qPCR constou de 12,5µL de SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems™), 2µL do cDNA (diluído 5 vezes), 100pMol.uL⁻¹ de *primers forward* e *reverse*, e água livre de nuclease em um volume total de 25µL. As amostras foram colocadas, em triplicata, em placas com capacidade para 96 reações, e cobertas com adesivo ótico. Os parâmetros de temperatura para a qPCR foram: 50°C/2min; desnaturação inicial a 95°C/10min, 40 ciclos de três etapas: desnaturação a 95°C/15seg; anelamento a 60°C/1min e; extensão 72°C/1min, a qual foi seguida pela curva padrão de dissociação, para verificar a especificidade dos *primers* utilizados. A eficiência de cada par de *primers* foi calculada utilizando-se a curva padrão de diluição seriada, como descrito no protocolo da Applied Biosystems™. O nível de expressão gênica foi calculado baseado no *threshold cycle* (Ct), onde o gene 16S rRNA foi utilizado como normalizador (padrão interno) e os genes de cada uma das EE, como os calibradores. Calculou-se o $\Delta\Delta CT$, o qual foi utilizado na equação de quantificação relativa para expressar os dados (YUAN et al., 2006):

$QR=2^{-\Delta\Delta CT}$, no qual QR (Quantificação Relativa) representa o nível de expressão gênica.

Os oligonucleotídeos utilizados na qPCR estão descritos na Tabela 2, assim como o produto de amplificação e o gene alvo.

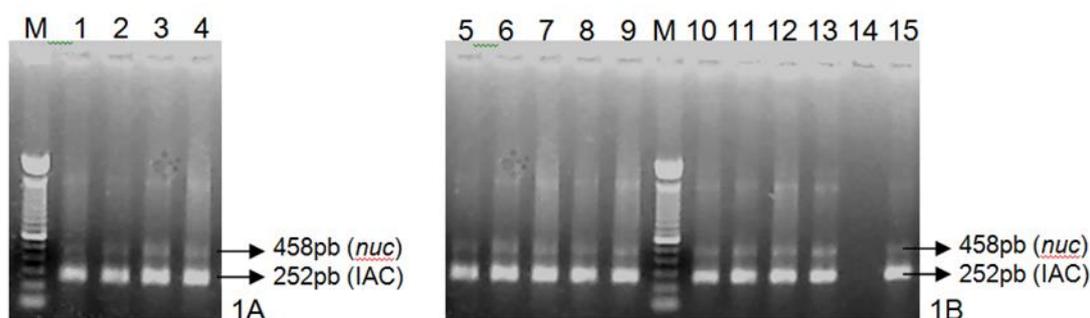
Tabela 2 – Oligonucleotídeos utilizados para quantificação das enterotoxinas clássicas por qPCR.

Oligonucleotídeos	Sequência 5´- 3´	Produto de amplificação (pb)	Alvo	Referência
EEAR1	AAAATACAGTACCTTTGGAAACGGTT	92	<i>eea</i>	Klotz, et al. 2003
EEAR2	TTTCCTGTAAATAACGTCTTGCTTGA			
EEBR1	ACACCCAACGTTTTAGCAGAGAG	81	<i>eeb</i>	Klotz, et al. 2003
EEBR2	CCATCAAACCAGTGAATTTACTCG			
EECR1	AATAAAACGGTTGATTCTAAAAGTGTGAA	80	<i>eec</i>	Klotz, et al. 2003
EECR2	ATCAAAATCGGATTAACATTATCCATTC			
EEDR1	TGATTCTTCTGATGGGTCTAAAGTCTC	115	<i>eed</i>	Klotz, et al. 2003
EEDR2	GAAGGTGCTCTGTGGATAATGTTTT			
EEER1	TCAATGTGCTGGAGGCACACCAA	51	<i>eee</i>	Este estudo
EEER2	ACACCCCGTACATACATGCTGTT			
16SR1	AAGTCCCGCAACGAGCGCAA	86	16S rRNA	Este estudo
16SR2	CCTCCGGTTTGTCACCGGCA			

4.3 Resultados e discussão

4.3.1 Identificação de *S. aureus* e dos genes das enterotoxinas clássicas por PCR

Obeve-se amplificação dos fragmentos esperados do gene *nuc*, com sequência específica para *S. aureus*, assim como do IAC, em todos os 13 isolados provenientes dos surtos de intoxicação estafilocócica, bem como na cepa padrão utilizada como controle positivo, como pode ser visualizado nas Figuras 1A e 1B.



Figuras 1A e 1B – Produtos da mPCR. Pista M – Marcador de peso molecular Ladder 100pb; Pistas 1 a 13 – Produto de mPCR obtido com isolados de *S. aureus* provenientes de surtos de intoxicação estafilocócica; Pista14 – Controle negativo (sem DNA); Pista 15 – Controle positivo (DNA de *S. aureus* FRI S6).

Como se pode observar nas Figuras 1A e 1B, em todos os isolados testados houve a amplificação de duas bandas, uma com 458pb, a qual representa o

fragmento estimado para o gene *nuc*, que identifica *S. aureus*, e outra com 252pb que representa o IAC. Dessa forma, todos os isolados provenientes de surtos de intoxicação estafilocócica no Rio Grande do Sul, no período de 2002 a 2004, foram confirmados em nível de espécie, pela PCR utilizada. A especificidade de sequências do gene *nuc* de *S. aureus*, tanto para identificação desta espécie bacteriana, como observado neste estudo, quanto para o controle de amplificação em PCR, foi demonstrada também em outros trabalhos, como os relatados por Cremonesi et al. (2005), Sasaki et al. (2010) e Gandra et al. (2010).

Os 13 isolados de *S. aureus* foram testados por PCR, quanto à presença dos genes das EE clássicas e observou-se que todos portavam pelo menos um dos genes dessas enterotoxinas, como pode ser visualizado na Tabela 3.

Tabela 3 – Detecção de genes de enterotoxinas estafilocócicas clássicas por PCR, em *S. aureus* isolados de surtos de intoxicação estafilocócica no Rio Grande do Sul, Brasil.

Isolado	Genes de enterotoxinas				
	<i>eea</i>	<i>eeb</i>	<i>eec</i>	<i>eed</i>	<i>eee</i>
C01	+	+	+	-	-
C02	+	-	+	+	-
C03	+	-	-	-	-
C04	+	-	+	-	-
C05	-	-	+	+	-
C06	+	-	-	+	-
C07	-	-	+	-	-
C08	-	-	+	-	-
C09	+	-	-	-	-
C10	+	-	+	-	-
C11	+	+	+	-	-
C12	-	+	-	-	+
C13	-	+	+	+	+

Embora neste estudo não se tenha informação a respeito de qual EE causou a intoxicação, tendo em vista que apenas os isolados foram encaminhados pelo LACEN, observa-se que o gene prevalente foi *eec* (9 isolados), seguido por *eea* (8 isolados), *eeb* e *eed* (4 isolados cada) e *eee*, com 2 isolados. A prevalência dos genes de EE tem sido variável nos diferentes estudos. Como exemplos citam-se Bendahou et al. (2009), que testaram 46 isolados de estafilococos coagulase positiva provenientes de leite e derivados lácteos, e encontraram o gene *eea* em 13 isolados, seguido de *eed* (8), *eeb* (3) e *eec* (2), sendo que nenhum carregava o gene *eee*. Já Rall et al. (2008), encontraram o gene *eea* em 41%, *eec* em 20,5%, *eed* em 12,8%, *eeb* em 7,7%, e *eee* em 5,1% dos 57 isolados de *S. aureus* provenientes de leite cru e pasteurizado.

A prevalência do gene *eec* encontrado nos isolados dos surtos avaliados neste estudo é relevante, haja vista que esta EE não está entre as mais envolvidas em casos e surtos de intoxicação alimentar estafilocócica: as enterotoxinas mais frequentemente envolvidas são A e D (JOHLER e STEPHAN, 2010, PINCHUK et al., 2010).

Dentre as cinco EE clássicas pesquisadas, o gene *eee* foi o que menos foi identificado entre os 13 isolados, o que corrobora os resultados demonstrados na literatura, onde surtos envolvendo a EEE são raros (OSTYN et al., 2010).

Cabe destacar que a presença do gene de uma enterotoxina não implica, necessariamente, na sua expressão e, por conseguinte, na produção da toxina (PELISSER et al., 2009). Dessa forma, é importante que se avalie a expressão dos genes de EE para que se possam ter respostas mais robustas sobre seu envolvimento em um caso/surto de intoxicação alimentar estafilocócica.

4.3.2 Expressão dos genes das enterotoxinas clássicas de *S. aureus* por PCR em tempo real (qPCR)

Todos os genes que foram detectados por PCR tiveram sua expressão relativa confirmada por qPCR. Ressalta-se que pela avaliação por PCR, os isolados C04 e C05 não portavam o gene *eeb*, assim como o isolado C06 não carregava os genes *eebe* e *eec*, entretanto, foram obtidos valores de Ct para esses genes, demonstrando a maior sensibilidade da técnica de qPCR.

A quantificação relativa (QR) da expressão das EE clássicas de cada isolado proveniente dos surtos de intoxicação foi comparada com a expressão das EE clássicas das cepas de referência, as quais apresentam uma QR igual a 1. Pode-se observar, na Figura 2, que todos os isolados, com exceção de C08 e C09, apresentaram expressão transcricional igual ou maior que a da cepa padrão, para pelo menos um dos genes das EE clássicas e que diversos isolados apresentaram uma expressão alta destas EE quando comparadas à cepa padrão.

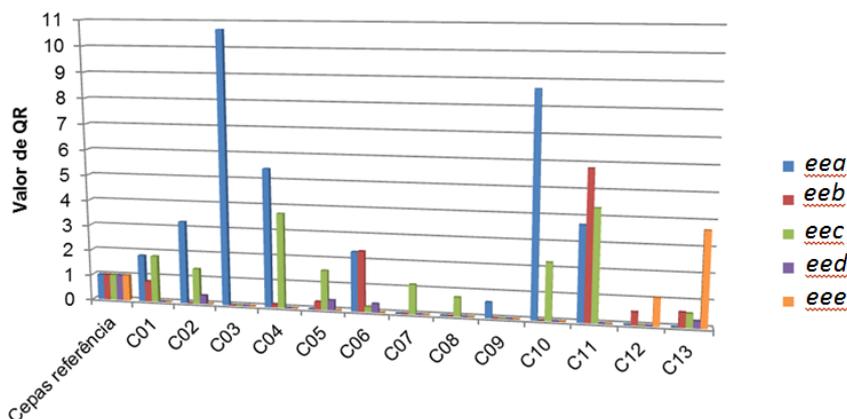


Figura 2: Comparação entre a expressão transcricional dos genes das enterotoxinas estafilocócicas clássicas em cepas de referência de *S. aureus* e em 13 isolados de *S. aureus* provenientes de surtos (C01 a C13).

Segundo Argudín et al. (2010) EEA é a principal EE implicada em surtos de intoxicação alimentar estafilocócica no mundo, seguida por EED, EEB e EEC, porém, neste estudo, foram detectados valores de Ct para os genes *eec* em 10 dos 13 isolados testados (77%), seguido de *eea* (62%), *eeb* (54%), *eed* (31%) e *eee* (15%).

De acordo com Derzelle et al. (2009), o nível de expressão das EE clássicas é distinto entre si, com EEB e EEC sendo expressas 10 vezes mais que EEA, EED e EEE. Neste estudo também se observou que há variação no nível de expressão, entretanto, os maiores níveis de expressão foram verificados para EEA, nos isolados C03 e C10 quando comparados a cepa padrão. Esse resultado é interessante, haja vista que sua elevada expressão, associada com sua resistência alta às enzimas proteolíticas, podem aumentar a probabilidade desta toxina ter sido a causadora das intoxicações alimentares as quais estão relacionadas. Já a EEB, possui sensibilidade relativamente elevada à pepsina em condições de estresse ácido (BERGDOLL, 1983), tornando-a menos resistente, quando comparada as outras EE clássicas.

Sete isolados carregavam o gene *eeb*, dos quais, C11 foi o que apresentou maior expressão desse gene, chegando a 5,8 vezes mais que a cepa padrão, como pode ser verificado na Figura 2. Alguns surtos de intoxicação alimentar estafilocócica já foram atribuídos a esta enterotoxina, como o descrito por Nema et al. (2007), que detectaram a presença da EEB e EED em um surto envolvendo batatas fritas em óleo vegetal.

EEA apresentou os maiores índices globais de expressão quando comparados à cepa padrão, entretanto, a EEC foi expressa em 10 dos 13 isolados de surtos. Os maiores valores de QR apresentados para essa enterotoxina foram 3,7 (isolado C04) e 4,3 (isolado C11) vezes mais altos que o da cepa padrão. Embora os níveis de expressão de EEC não tenham sido tão elevados quanto os da EEA, são altos quando comparados à cepa padrão. Aliado a isso, sua expressão em 77% dos isolados provenientes dos surtos é um resultado relevante.

EED é descrita na literatura como a segunda EE mais associada com intoxicação alimentar estafilocócica em todo o mundo, entretanto, foi a quarta toxina mais prevalente neste estudo, sendo EEE a menos prevalente. Todos os quatro isolados (31%) que apresentaram valores de Ct para o gene *eed* apresentaram um valor de QR entre 0,3 e 0,4 vezes o valor da cepa padrão. No entanto, é importante destacar que quantidades muito pequenas desta toxina podem induzir a intoxicação alimentar (BERGDOLL et al., 1981, PINCHUK et al., 2010).

Um resultado interessante é que, mesmo que tenha sido observada expressão da EEE em apenas dois isolados, os níveis de expressão desse gene foram elevados quando comparados ao da cepa padrão. O isolado C12 apresentou o mesmo valor de expressão transcricional que a cepa padrão e o isolado C13, uma expressão 3,7 vezes maior. Existem poucos surtos descritos envolvendo essa EE, entretanto, a detecção do gene *eee* por PCR, bem como a expressão desta enterotoxina nos isolados avaliados neste estudo, permite inferir que a EEE pode ter sido responsável pelos surtos dos quais estes foram provenientes, isoladamente ou em associação com outras EE.

Não se pode afirmar qual(is) a(s) EE foram realmente implicada(s) nos surtos avaliados, tendo em vista que fatores inerentes ao alimento ou ao ambiente no qual esse foi armazenado podem interferir na sua expressão. Ressalta-se que, neste estudo, as condições de cultivo foram ideais em termos de temperatura (37°C) e de nutrientes, para a multiplicação de *S. aureus* e produção de EE. Entretanto, levando-se em consideração que mais de 95% dos surtos de intoxicação estafilocócica são causados pelas EE clássicas, bem como os resultados obtidos para a presença dos genes por PCR e que foram corroborados pela expressão gênica por qPCR, verifica-se que uma ou mais EE clássicas podem ter causado os surtos avaliados

Quatro isolados, C03, C07, C08 e C09, carreavam e expressaram apenas um dos genes das EE clássicas. Este resultado, associado à elevada prevalência das

EE clássicas nos surtos de intoxicação estafilocócica, infere que EEA, EEC, EEC e EEA, respectivamente, foram as responsáveis nos surtos dos quais aqueles isolados foram obtidos. Outros autores como Asao et al. (2003), Giezendanner et al. (2009) e Ostin et al. (2010) também relataram surtos envolvendo apenas uma EE, no entanto, surtos causados pela presença de mais de uma EE já foram descritos por Nema et al. (2007), Kitamoto et al. (2009) e Schimid et al. (2009), o que também foi verificado neste estudo, onde os isolados C01, C02, C10, C11, C12 e C13 carregavam e apresentaram expressão de dois ou mais genes de EE, demonstrado por PCR e por qPCR.

De acordo com Becker et al. (2007), a presença de mais de uma EE dificulta a identificação daquela causadora do surto, entretanto, quando o isolado carrega mais de um gene de EE, estes podem ser expressos conjuntamente, o que pôde-se observar neste estudo. Dessa forma, entre os 13 surtos investigados neste estudo, pode-se inferir que em nove deles, mais de uma EE clássicas podem ter causado a intoxicação.

Quando se avaliou por PCR, verificou-se que os isolados C04 e C05 não portavam o gene *eeb*, assim como o isolado C06 não carregava os genes *eeb* e *eec*. Entretanto, por qPCR, esses isolados apresentaram expressão dessas EE. Esse resultado corrobora outros estudos que relatam a maior sensibilidade da qPCR, na qual os resultados são expressos pelo equipamento e em números e não por visualização dos produtos amplificados em gel de agarose, como no caso da PCR tradicional. Salienta-se que nestes três isolados (C04, C05 e C06), mesmo não havendo a detecção por PCR de alguns dos genes das EE, estas podem ter sido as causadoras dos surtos nos quais aqueles isolados foram obtidos.

4.4 Conclusão

Embora não se tenha a informação a respeito de qual a enterotoxina causou a intoxicação alimentar estafilocócica nos surtos avaliados, a prevalência das enterotoxinas clássicas nos isolados provenientes dos surtos, associada aos seus elevados níveis de expressão transcricional, demonstram que uma ou mais enterotoxinas clássicas causaram os surtos de intoxicação alimentar dos quais esses isolados foram obtidos.

4.5 Referências

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, 2009.

ARGUDÍN, M. A.; MENDOZA, M. C.; RODICIO, M. R. Food Poisoning and *Staphylococcus aureus* Enterotoxins.**Toxins**.p. 1751 – 1773, 2010.

ASAO, T.; KUMEDA, Y.; KAWAI, T.; SHIBATA, T.; ODA, H.; HARUKI, K.; NAKAZAWA, H.; KOZAKI, S. An extensive outbreak of staphylococcal food poisoning due to low-fat milk in Japan: estimation of enterotoxin A in the incriminated milk and powdered skim milk. **Epidemiology and Infection**.v. 130, p. 33 – 40, 2003.

BALABAN, N.; RASOOLY, A. Staphylococcal Enterotoxin.**International Journal Of Food Microbiology**. v.61, p. 1-10, 2000.

BARON, F., COCHET, M. O., PELLERIN, J.L., ZAKOUR, N. B., LEBON, A., NAVARRO, A., PROUDY, I., LE LOIR, Y., GAUTIER, M. Development of a PCR test to differentiate between *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus intermedius*. **Journal of Food Protection**.v.67, p.2302–2305, 2004.

BECKER, H.; BÜRK, C.; MÄRTLBAUER, E. Staphylokokken-Enterotoxine: bildung, eigenschaften und nachweis. v. 2, p. 171 – 189, 2007.

BENDAHOU, A.; ABID, M.; BOUTELDOUN, N.; CATELEJINE, D.; LEBBADI, M. Enterotoxigenic coagulase positive *Staphylococcus* in milk and milk products, lben and jben, in northern Morocco. **The Journal of Infection Developing Countries**. v. 3, p. 169 – 176, 2009.

BERGDOLL, M.S.; CRASS, B.A.; REISER, R.F.; ROBBINS, R.N.; DAVIS, J.P. A New Staphylococcal Enterotoxin, Enterotoxin F, Associated with Toxic-Shock-Syndrome Staphylococcus aureus Isolates. **Lancet**. v. 1, p. 1017–1021,1981.

BERGDOLL, M. S. Staphylococci and Staphylococcal Infections. **Enterotoxins**. p. 559-598, 1983.

BRITO, M.A.V.P.; CAMPOS, G.M.M.; BRITO, J.R.F. Esquema simplificado para identificação de Estafilococos coagulase-positivos isolados de mastite bovina. **Ciência Rural**. v. 32, p. 79 – 82, 2002.

CARMO, L. S.; DIAS, R. S.; LINARDI, R.; SENA, M.J.; SANTOS, D. A.; FARIA, M. E.; PENA, C.; JETT, M.; HENEINE, G. Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in Minas cheese and raw milk in Brazil. **Food Microbiology**. v. 19, p. 9-14, 2002.

CREMONESI, P.; LUZZANA, M.; BRASCA, M.; MORANDI, S.; LODI, R.; VIMERCATI, C.; AGNELLINI, D.; CARAMENTI, G.; MORONI, P.; CASTIGLIONI, B. Development of a multiplex PCR assay for the identification of *Staphylococcus aureus* enterotoxigenic strains isolated from milk and dairy products. **Molecular and Cellular Probes**. v. 19, p. 299–305, 2005.

DERZELLE, S.; DILASSER, F.; DUQUENNE, M.; DEPERROIS, V. Differential temporal expression of the staphylococcal enterotoxins genes during cell growth. **Food Microbiology**. v. 26, p. 896 – 904, 2009.

DINGES, M. M.; ORWIN, P. M.; SCHLIEVERT, P. M. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. **Clinical Microbiology.Reviews**. v. 13, n.1, p.16–34, 2000.

DO CARMO, L. S.; CUMMINGS, C.; LINARDI, V. R.; DIAS, R. S.; DE SOUZA, J. M.; DE SENA, M. J.; DOS SANTOS, D. A.; SHUPP, J. W.; PEREIRA, R. K.; JETT, M. A case study of a massive staphylococcal food poisoning incidente. **Foodborne pathogens disease**. v. 4, p. 241 – 246, 2004.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. 2 ed. São Paulo: Editora Atheneu, p. 184, 2002.

FREIRAS, M. F. L. DE; LEAL BALBINO, T. C.; MOTA, R. DO A.; STAMFORD, T. L. M. Exotoxinas estafilocócicas. **Ciências Veterinárias nos Trópicos**. v. 7, n. 2 e 3, p. 63-74, 2004.

FUSCO, V.; MARINA, G.; MOREA, M.; BLAIOTTA, G.; VISCONTI, A. International Journal of Food Microbiology Rapid and reliable identification of *Staphylococcus aureus* harbouring the enterotoxin gene cluster (*egc*) and quantitative detection in raw milk by real time PCR. **International Journal of Food Microbiology**. v. 144, n. 3, p. 528 – 537, 2011.

GANDRA, E. A., SILVA, J. A., MACEDO, M. R. P., ARAÚJO, M. R., MATA, M. M., SILVA, W. P. Biochemical differentiation among *S. aureus*, *S. Intermedius* and *S. hyicus* isolated from bovines with subclinical mastitis. **Archives of Veterinary Science**. v.10, n.1, p. 75 - 81, 2005.

GANDRA E. A., FERNANDEZ, M. A., SILVA, J. A., SILVA, W. P. Standardization of a multiplex PCR for the identification of coagulase-positive *Staphylococcus*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 31, n. 4, p. 946 – 949, 2010.

GIEZENDANNER, N.; MEYER, B.; GORT, M.; MULLER, P.; ZWEIFEL, C. Raw milk-associated *Staphylococcus aureus* intoxication in children. **Schweizer Archiv Tierheilkunde**. v. 7, n. 151, p. 329 – 331, 2009.

HOLECKOVÁ, B., HOLODA, E., FOTTA, M. Occurrence of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in food. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**. v. 9, p. 179-182, 2002.

IKEDA T., TAMATE N., YAMAGUCHI K., MAKINO S. I. Mass outbreak of food poisoning disease caused by small amounts of Staphylococcal enterotoxins A and H. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 71, n. 5, p. 2793–2795, 2005.

JARRAUD, S.; MOUGEL, C.; THIOULOUSE, J.; LINA, G.; MEUGNIER, H.; FOREY, F.; NESME, X.; ETIENNE, J.; VANDENESCH, F. Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, agr groups (alleles), and human disease. **Infection and Immunity**. v. 70, p. 631–641, 2002.

JOHLER, S.; STEPHAN, R. Staphylococcal food poisoning: a current review. **Archiv für Lebensmittelhygiene**. v. 61, p. 220-228, 2010.

JØRGENSEN H. J., MATHISEN T., LØVSETH 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**. p. 267 – 272, 2005.

KITAMOTO, M.; KITO, K.; NIIMI, Y.; SHODA, S.; TAKAMURA, A.; HIRAMATSU, T.; AKASHI, T.; YOKOI, Y.; HIRANO, H.; HOSOKAWA, M.; YAMAMOTO, A.; AGATA, N.; HAMAJIMA, N. Food poisoning by *Staphylococcus aureus* at a university festival. **Japanese Journal of Infectious Diseases**. v. 62, p. 242 – 243, 2009.

KLOTZ, M.; OPPER, S.; HEEG, K.; ZIMMERMANN, S. Detection of *Staphylococcus aureus* enterotoxins A to D by Real-Time Fluorescence PCR Assay. **Journal of Clinical microbiology**. v. 41, n. 10, p. 4683–4687, 2003.

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.

LETERTRE, C.; PERELLE, S.; DILASSER, F.; FACH, P. Detection and genotyping by real-time PCR of the staphylococcal enterotoxin genes *sea* to *sej*. **Molecular and Cellular Probes**. v. 17, n.4, p. 139 – 147, 2003.

MATTHEWS, K. R., J. ROBERSON, B. E. GILLESPIE, D. A. LUTHER, S. P. OLIVER. Identification and differentiation of coagulase-negative *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction. **Journal of Food Protection**. v.60, p. 686-688, 1997.

NEMA, V.; AGRAWAL, R.; KAMBOJ, D. V.; GOEL, A. K. SINGH, L. Isolation and characterization of heat resistant enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* from a food poisoning outbreak in Indian subcontinent. **International Journal of Food Microbiology**. v. 117, p. 29 – 35, 2007.

OMOE, K.; ISHIKAWA, M.; SHIMODA, Y.; HU D. L.; UEDA, S.; SHINAGAWA, K. Detection of *seg*, *seh*, and *sei* genes in *Staphylococcus aureus* isolates and Determination of the Enterotoxin Productivities of *S. aureus* Isolates Harboring *seg*, *seh*, or *sei* Genes. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 40, n. 3, p. 857–862, 2002.

OSTYN, A.; DE BUYSER, M. L. GUILLIER, F. GROULT, J. FELIX, B. SALAH, S.; DELMAS, G. HENNEKINNE, J. A. First evidence of a food poisoning outbreak due to staphylococcal enterotoxin type E, France, 2009. **Euro Surveill** 15. 2010.

PELISSER, M. R.; KLEIN, C. S.; ASCOLI, K. R.; ZOTTI, T. R.; ARISI, A. C. M. Occurrence of *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.

PINCHUK, I. V.; BESWICK, E. J.; REYES, V. E. Staphylococcal enterotoxins. **Toxins**. v.2, p. 2177-2197, 2010.

RALL, V. L. M.; VIEIRA, F. P.; RALL, R.; VIEITIS, R. L.; FERNANDES, A.; CANDEIAS, J. M. G.; CARDOSO, K. F. G.; ARAÚJO, J. P. PCR detection of staphylococcal enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw and pasteurized milk. **Veterinary Microbiology**. v. 132, p. 408 – 413, 2008.

ROSEC, J.P., GIGAUD, O. Staphylococcal enterotoxin genes of classical and new types detected by PCR in France. **International Journal of Food Microbiology**. v. 77, p. 61-70, 2002.

SASAKI, T.; TSUBAKISHITA, S.; TANAKA, Y.; SAKUSABE, A.; OHTSUKA, M.; HIROTAKI, S.; KAWAKAMI, T.; FUKATA, T.; HIRAMATSU, K. Multiplex-PCR method for species identification of coagulase-positive Staphylococci. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 48, n. 3, p. 765–769, 2010.

SCHMID, D., FRETZ, R., WINTER, P., MANN, M., HÖGER, G., STÖGER, A., RUPPITSCH, W., LADSTÄTTER, J., MAYER, N., DE MARTIN, A., ALLERBERGER, F. Outbreak of staphylococcal food intoxication after consumption of pasteurized milk products, June 2007, Austria. **Wiener Klinische Wochenschrift**. v. 121, p. 125–131, 2009.

TAMARAPU, S.; MCKILLIP, J.L.; DRAKE, M. Development of a multiplex polymerase chain reaction assay for detection and differentiation of *Staphylococcus aureus* in dairy products. **Journal of Food Protection**. v. 64, p. 664–668, 2001.

VALASEK, M. A.; REPA J. J. The power of real-time PCR. **Advances in Physiology Education**. v. 29, n. 3, p. 151-159, 2005.

YUAN, J. S.; ANN REED, A.; CHEN, F.; STEWART C. N. Statistical analysis of real-time PCR data. **BMC Bioinformatics**. p. 1 – 12, 2006.

ZOCHE, F.; FRANÇA, R. C.; ALEIXO, J. A. G.; MOREIRA, A. N.; SILVA, W. P. PCR multiplex para detecção de *staphylococcus aureus* enterotoxigênicos isolados de alimentos de origem animal no sul do Rio Grande do Sul, Brasil. **Interciencia**. v. 34, n. 7, p. 487-491, 2009.

5 Artigo 2: Presença e expressão de genes de enterotoxinas estafilocócicas clássicas em *S. aureus* isolados de carcaças de frango

Presença e expressão de genes de enterotoxinas estafilocócicas clássicas em *S. aureus* isolados de carcaças de frango

BASTOS, Caroline Peixoto¹; BASSANI, Milena Tomasi²; SILVA, Wladimir Padilha da³

Resumo

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) é um dos agentes etiológicos mais relacionados a casos e surtos de intoxicação alimentar, os quais são causados pelas enterotoxinas estafilocócicas (EE). Das 22 EE descritas na literatura, aproximadamente 95% dos surtos de intoxicação alimentar estão associados às EE clássicas (EEA, EEB, EEC, EED e EEE). A detecção da presença dos genes destas toxinas tem sido alvo de estudo nos últimos anos, no entanto, poucos estudos têm avaliado a sua expressão. Sendo assim, este trabalho teve por objetivo verificar a presença e os níveis de expressão dos genes das EE clássicas em *S. aureus* isolados de carcaça de frango no sul do Rio Grande do Sul, Brasil. Foram utilizados 30 isolados de *S. aureus*, provenientes de carcaças de frango, avaliando-se a presença dos genes das EE clássicas por PCR e a sua expressão relativa por PCR em tempo real (qPCR). Os isolados de *S. aureus* provenientes de carcaças de frango no sul do Rio Grande do Sul apresentam potencial toxigênico. Doze isolados portavam os genes dessas EE, sendo que em apenas cinco observou-se expressão transcricional desses genes. Entretanto, nos cinco isolados houve expressão de mais de um gene de EE e, pelo menos um gene, apresentava valores de quantificação relativa (QR) maior que o dos genes das EE das cepas padrão.

Palavras-chave: Expressão gênica. Enterotoxina estafilocócica clássica. *Staphylococcus aureus*. PCR. qPCR.

¹Química de Alimentos, M. Sc., Doutoranda do Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos - Laboratório de Microbiologia de Alimentos – DCTA - FAEM – UFPel. campus universitário s/n – caixa postal 354 – 96010000 – Pelotas – RS, Brasil. Telefone: 55(53)32757258 ramal 202. Email: carolpebastos@yahoo.com.br

²Médica Veterinária, M.Sc., Doutoranda do Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos – Laboratório de Microbiologia de Alimentos – DCTA - FAEM – UFPel. campus universitário s/n – caixa postal 354 – 96010000 – Pelotas – RS, Brasil. Telefone: 55(53)32757258 ramal 202. Email: mtbassani@yahoo.com.br

³Médico Veterinário, Professor, Dr, Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos – Laboratório de Microbiologia de Alimentos - DCTA - FAEM – UFPel. campus universitário s/n – caixa postal 354 – 96010000 – Pelotas – RS, Brasil. Telefone: 55(53)32757258 ramal 203. Email: silvawp@ufpel.edu.br

Abstract

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) is one of the etiologic agents more related to food poisoning, which are caused by staphylococcal enterotoxins (SE). From the 22 SE described in the bibliography, approximately 95% of food poisoning outbreaks are associated to classic SE (SEA, SEB, SEC, SED and SEE). The detection of the presence of genes of these toxins has been the aim of studies over the last years, nevertheless, few studies have evaluated its expression. Thus, this study aimed at verifying the presence and the levels of expression of genes of classic SE in isolated *S. aureus* of chicken carcass in the south of Rio Grande do Sul, Brazil. It has been used 30 isolated of *S. aureus*, originated from chicken carcass, evaluating the presence of genes of classic SE by PCR and its expression related by PCR real time (qPCR). The isolated of *S. aureus* originated from chicken carcass in the south of Rio Grande do Sul have presented toxigenic potential. Twelve isolated carried the genes of these SE, being that in only five has been observed the transcriptional expression of these genes. Nevertheless, in the five isolated there was expression of more of SE gene and, at least one gene, has presented related quantification (QR) value bigger than SE genes of standard strain.

Keywords: Gene expression. Classic staphylococcal enterotoxins. *Staphylococcus aureus*. PCR. qPCR.

5.1 Introdução

O gênero *Staphylococcus* é formado por 47 espécies e 24 subespécies (EUZÉBY, 2013). Entre as espécies deste gênero, a mais relacionada a casos e a surtos de intoxicação alimentar é *S. aureus*, devido a sua capacidade de produzir enterotoxinas estafilocócicas (EE), que são os agentes causais de uma das mais frequentes intoxicações de origem alimentar, a intoxicação alimentar estafilocócica (AL-TARAZI et al., 2009, FUSCO et al. 2011).

Vinte e duas EE foram descritas e 10 já foram associadas a intoxicações alimentares (EEA, EEB, EEC1, EEC2, EEC3, EED, EEE, EEG, EEH e EEI) (CENCI-GOGA et al., 2003), sendo que as EE clássicas (EEA, EEB, EEC, EED e EEE) são as mais estudadas e responsáveis por, aproximadamente, 95% dos casos/surtos

(AL-TARAZI et al., 2009, JOHLER e STEPHAN, 2010, WALLIN-CARLQUIST et al., 2010).

Esta intoxicação resulta da ingestão de EE pré-formadas em alimentos contaminados com *S. aureus* (NEMA et al., 2007). Vários alimentos já foram incriminados em surtos, mas os produtos de origem animal, principalmente aqueles que envolvem grande manipulação, são os mais frequentemente envolvidos (PELES et al., 2007, RŮŽIČKOVÁ et al., 2008), portanto, a pesquisa de *S. aureus* nesses alimentos e a avaliação de seu potencial em produzir EE, são fatores extremamente importantes na investigação epidemiológica e na análise de risco dessa doença (LANCETTE e BENNETT, 2001). Muitos estudos têm avaliado a presença de genes das EE em *S. aureus* isolados de alimentos (RALL et al., 2008, BENDAHOU et al., 2009, GIEZENDANNER et al., 2009), entretanto, poucos têm focado na análise de sua expressão. A técnica de PCR em tempo real (qPCR) permite essa análise, monitorando o progresso da amplificação de cDNA em tempo real. É um dos métodos quantitativos mais sensíveis e confiáveis, permitindo detectar e quantificar quantidades muito pequenas de sequências específicas de ácidos nucleicos (VALASEK e REPA, 2005, YUAN et al., 2006). Segundo Johler e Stephan (2010), a quantidade de transcritos é correlacionada com a quantidade de EE produzida, logo, o nível de expressão de genes de EE poderia ser utilizado para avaliar o potencial toxigênico em diferentes isolados. Sendo assim, este trabalho teve como objetivo verificar a presença e os níveis de expressão das EE clássicas (EEA, EEB, EEC, EED e EEE) em *S. aureus* isolados de carcaça de frango no sul do Rio Grande do Sul, Brasil.

5.2 Material e métodos

5.2.1 Identificação de *S. aureus*

Foram utilizados 30 isolados provenientes de carcaças de frango e cepas padrão de *S. aureus*, FRI S6, carreadora dos genes *eea* e *eeb*, FRI 361 carreadora dos genes *eec* e *eed*, e FRI 326 carreadora do gene *eee*, pertencentes ao Banco de Cepas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos do DCTA/FAEM, da Universidade Federal de Pelotas (UFPel). Todos os isolados e as cepas padrão passaram por testes bioquímicos adicionais, como os de avaliação da resistência à

acriflavina e de produção de catalase, conforme descrito por Brito et al. (2002) e Gandra et al. (2005), e foram mantidos em ágar Conservação, até o momento do uso.

5.2.2 Amplificação dos genes das EE clássicas por PCR

Para a amplificação das EE clássicas foram realizadas PCR, tendo como alvo os genes *eea*, *eeb*, *eec*, *eed* e *eee*. Na Tabela 1 estão citados os oligonucleotídeos utilizados para a amplificação dos genes das EE clássicas.

Tabela 1 -Oligonucleotídeos utilizados para identificação das enterotoxinas clássicas de *S. aureus*.

Oligonucleotídeos	Sequência 5´- 3´	Produto de amplificação (pb)	Alvo	Referência
EEA1	ACGATCAATTTTTACAGC	544	<i>eea</i>	Rosec e Gigaud (2002)
EEA2	TGCATGTTTTTCAGAGTTAATC			
EEB1	ATTCTATTAAGGACACTAAGTTAGGGGA	404	<i>eeb</i>	Jarraud et al. (2002)
EEB2	ATCCCGTTTCATAAGGCGAGT			
EEC1	GTAAAGTTACAGGTGGCAAACCTTG	297	<i>eec</i>	Jarraud et al. (2002)
EEC2	CATATCATAACCAAAAAGTATTGCCGT			
EED1	CAAATATATTGATATAATGA	330	<i>eed</i>	Zocche et al. (2009)
EED2	AGTAAAAAAGAGTAATGCAA			
EEE1	CAAAGAAATGCTTTAAGCAATCTTAGGC	482	<i>eee</i>	Jarraud et al. (2002)
EEE2	CACCTTACCGCCAAAGCTG			

Para extração de DNA, as células bacterianas foram inoculadas em ágar Trypticase de Soja (TSA, Merck®) e incubadas a 37°C por 24 horas. Após esse período, o DNA genômico foi extraído de acordo com protocolo proposto por Matthews et al. (1997). A qualidade e a quantidade de DNA extraídos foram estimadas por eletroforese em gel de agarose 1%, comparando-se com o padrão de massa molecular DNA/HindIII (Invitrogen®).

Os produtos de amplificação das PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1,2%, corados com brometo de etídeo, e visualizados sob iluminação ultravioleta, sendo comparados com o marcador de massa molecular 100pb DNA Ladder (Invitrogen®).

5.2.3 Expressão dos genes das EE clássicas por PCR em tempo real (qPCR)

Após a verificação da presença dos genes por PCR foi realizada a qPCR, onde, primeiramente, foi feita uma extração do RNA total, sendo as células bacterianas inoculadas em ágar Trypticase de Soja (TSA, Merck®) e incubadas a 37°C. Após 24 horas, uma colônia isolada foi retirada do TSA, inoculada em caldo Brain Heart Infusion (BHI, Merck®) e incubada a 37°C por 24 horas. Posteriormente, o RNA foi extraído e purificado com o RiboPure™-Bacteria Kit (Ambion®), de acordo com o protocolo comercial. A qualidade dos RNAs foi verificada em gel de agarose a 1,5% (m/v). A síntese de cDNA foi realizada com o High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems®), de acordo com as instruções do fabricante.

A avaliação por qPCR foi realizada em termociclador 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems™). A qPCR constou de 12,5µL de SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems™), 2µL do cDNA (diluído 5 vezes), 100pMol.µL⁻¹ de *primers forward* e *reverse*, e água livre de nuclease em um volume total de 25µL. As amostras foram colocadas, em triplicata, em placas com capacidade para 96 reações, e cobertas com adesivo ótico. Os parâmetros de temperatura para a qPCR foram: 50°C/2min; desnaturação inicial a 95°C/10min, 40 ciclos de três etapas: desnaturação a 95°C/15seg; anelamento a 60°C/1min e; extensão 72°C/1min, a qual foi seguida pela curva padrão de dissociação, para verificar a especificidade dos *primers* utilizados. A eficiência de cada par de *primers* foi calculada utilizando-se a curva padrão de diluição seriada, como descrito no protocolo da Applied Biosystems™. O nível de expressão gênica foi calculado baseado no *threshold cycle* (Ct), onde o gene 16S rRNA foi utilizado como normalizador (padrão interno) e os genes de cada uma das EE, como os calibradores. Calculou-se o $\Delta\Delta CT$, que foi utilizado na equação de Quantificação Relativa para expressar os dados (YUAN et al., 2006):

$QR=2^{-\Delta\Delta CT}$, no qual QR (Quantificação Relativa) representa o nível de expressão gênica.

Os oligonucleotídeos utilizados na qPCR estão descritos na Tabela 2, assim como o produto de amplificação e o gene alvo.

Tabela 2 – Oligonucleotídeos utilizados para quantificação das enterotoxinas clássicas por qPCR.

Oligonucleotídeos	Sequência 5´- 3´	Produto de amplificação (pb)	Alvo	Referência
EEAR1	AAAATACAGTACCTTTGGAAACGGTT	92	<i>eea</i>	Klotz, et al. 2003
EEAR2	TTTCCTGTAATAACGTCTTGCTTGA			
EEBR1	ACACCCAACGTTTTAGCAGAGAG	81	<i>eeb</i>	Klotz, et al. 2003
EEBR2	CCATCAAACCAGTGAATTTACTCG			
EECR1	AATAAAACGGTTGATTCTAAAAGTGTGAA	80	<i>eec</i>	Klotz, et al. 2003
EECR2	ATCAAAATCGGATTAACATTATCCATTC			
EEDR1	TGATTCTTCTGATGGGTCTAAAGTCTC	115	<i>eed</i>	Klotz, et al. 2003
EEDR2	GAAGGTGCTCTGTGGATAATGTTTT			
EEER1	TCAATGTGCTGGAGGCACACCAA	51	<i>eee</i>	Este estudo
EEER2	ACACCCCGTACATACATGCTGTT			
16SR1	AAGTCCCGCAACGAGCGCAA	86	16SrRNA	Este estudo
16SR2	CCTCCGGTTTGTACCCGGCA			

5.3. Resultados e discussão

5.3.1 Identificação dos genes das enterotoxinas clássicas por PCR

A toxigenicidade de *S. aureus* é muito variável entre cepas e vários estudos epidemiológicos foram conduzidos para avaliar o percentual de cepas enterotoxigênicas em distintas fontes (HWANG et al., 2007; ZOCHE et al., 2009). Diversas hipóteses têm sido propostas para esclarecer essa variação, entre elas, a origem dos isolados (CHEN et al., 2004).

Neste estudo, dos 30 isolados de *S. aureus* testados por PCR para a presença dos genes das EE clássicas, observou-se que 12 (40%) portavam um ou mais genes dessas enterotoxinas (Tabela 3).

Tabela 3 – Detecção de genes de enterotoxinas estafilocócicas clássicas por PCR em *S. aureus* isolados de carcaças de frango.

Isolado	Genes das enterotoxinas				
	<i>eea</i>	<i>eeb</i>	<i>eec</i>	<i>eed</i>	<i>eee</i>
R01	-	-	-	+	-
R02	-	+	-	-	-
R03	-	+	-	+	-
R04	-	-	-	+	-
R05	-	-	-	+	-
R06	-	-	-	+	-
R07	-	-	-	+	-
R08	-	-	+	-	-
R09	-	-	+	-	-
R10	-	-	+	-	-
R11	-	-	-	+	-
R12	-	-	+	-	-

Nenhum dos isolados carregava os genes *eea* e *eee*, entretanto, a prevalência de *S. aureus* portadores dos genes *eeb*, *eec* e *eed*, foi de 6,6, 13,3 e 23,3% respectivamente. O índice de 40% de isolados de *S. aureus* potencialmente toxigênicos é elevado quando comparado ao descrito por outros autores. Hwang et al. (2007), analisando 87 *S. aureus* isolados de carne de frango, encontraram 5,7% albergando o gene *eea*, e nenhum portando os genes das outras EE clássicas. Já Kwon et al. (2004) e Smyth et al. (2005), após avaliarem 39 e 15 *S. aureus* isolados de carcaça de frangos, respectivamente, não detectaram isolados portadores dos genes de EE clássicas.

No entanto, outro estudo, realizado na mesma região desta pesquisa (ZOCCHÉ et al., 2009), também encontrou índice elevado de isolados toxigênicos, onde, de 9 isolados de *S. aureus* provenientes de carcaça de frango, 4 (44,4%) apresentaram os genes *eeb* e *eed*.

Dos 12 isolados de *S. aureus* que carregavam genes de EE clássicas, um albergava dois genes, isolado R03, o que já foi demonstrado por outros autores (NÁJERA-SÁNCHEZ et al., 2003; SILVA et al., 2005; ZOCCHÉ et al., 2009). A presença de mais de um gene de EE em um mesmo isolado apresenta relevância epidemiológica, tendo em vista a possibilidade de haver produção simultânea das duas enterotoxinas, conforme já descrito por Silva et al. (2005).

5.3.2 Expressão dos genes das enterotoxinas clássicas de *S. aureus* por PCR em tempo real (qPCR)

A presença dos genes de enterotoxinas em *S. aureus* é um indicativo de sua toxigenicidade, entretanto, vários fatores influenciam em sua expressão. Nesse estudo observou-se que doze isolados de *S. aureus* portavam genes das EE clássicas, entretanto, cinco (R06, R08, R09, R11 e R12) tiveram sua expressão relativa confirmada por qPCR. Resultados semelhantes foram obtidos por Morandi et al. (2007), que avaliaram 107 estafilococos coagulase positiva quanto a presença dos genes de EE e verificaram que 67% dos isolados portavam esses genes, entretanto, 52% foram capazes de expressá-los.

Pela qPCR pode-se observar que houve expressão de genes de EE clássicas que não foram detectados por PCR (Tabela 4, Figura 1). Destaca-se, por exemplo, os isolados R09 e R12, que apresentaram os maiores níveis de expressão

transcricional para o gene *eeb*, o qual não foi detectado por PCR. Isto pode ser explicado devido a maior sensibilidade da qPCR, aliado ao fato de que a PCR apresenta como uma das desvantagens, a dificuldade em visualizar o produto da PCR, quando esse forma bandas muito fracas no gel, o que pode produzir resultados falso negativos.

Tabela 4 –Comparação entre a detecção e a expressão dos genes das enterotoxinas estafilocócicas clássicas por PCR e qPCR respectivamente, em *S. aureus* isolados de carcaças de frango.

Isolado	Genes de enterotoxinas									
	<i>eea</i>		<i>eeb</i>		<i>eec</i>		<i>eed</i>		<i>eee</i>	
	PCR	qPCR	PCR	qPCR	PCR	qPCR	PCR	qPCR	PCR	qPCR
R01	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
R02	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
R03	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-
R04	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
R05	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
R06	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-
R07	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
R08	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-
R09	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-
R10	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
R11	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-
R12	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-

A Quantificação Relativa (QR) da expressão das EE clássicas de cada isolado proveniente de carcaças de frango foi comparada com a expressão dos genes das EE clássicas de cepas padrão, cuja QR = 1. Observa-se (Figura 1), que todos os cinco isolados apresentaram expressão transcricional maior que a da cepa padrão, em pelo menos um dos genes das EE clássicas.

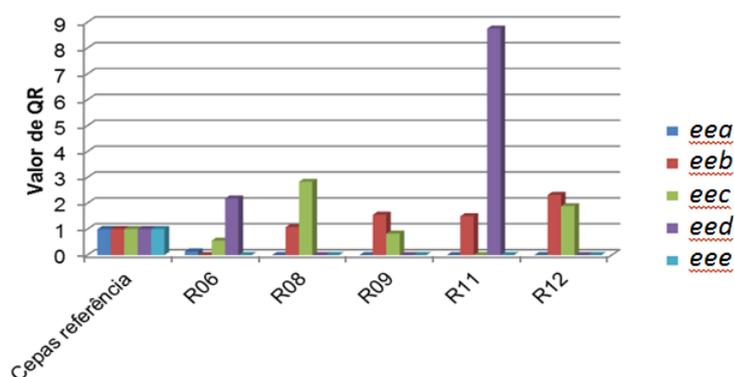


Figura 1: Expressão transcricional dos genes das enterotoxinas clássicas em cepas padrão de *S. aureus* em comparação com 5 isolados provenientes de carcaça de frango (isolados R06, R08, R09, R11 e R12).

De acordo com Derzelle et al. (2009), o nível de expressão dos genes das EE clássicas é distinto entre si, com *eeb* e *eec* sendo expressos 10 vezes mais que *eea*, *eed* e *eee*. Neste estudo, também se observou que há variação, entretanto, a maior expressão foi verificada para *eed*, no isolado R11, a qual foi 8,75 vezes maior que na cepa padrão para esse mesmo gene. Apenas dois isolados (R06 e R11) apresentaram valores de Ct para o gene *eed*, no entanto, os valores de QR foram altos quando comparados ao da cepa padrão, destacando o potencial de toxigenicidade desses dois isolados, aliado ao fato que essa EE, juntamente com a EEA, são as enterotoxinas mais implicadas em surtos de intoxicação alimentar estafilocócica no mundo (Argudín et al., 2010). Em trabalho realizado pelo nosso grupo de pesquisa (dados enviados à publicação) onde foram avaliados 13 isolados de surtos ocorridos no Rio Grande do Sul, também foram encontrados valores de Ct para o gene *eed*, no entanto, os valores de expressão relativa encontrados foram baixos, sendo de 0,3 a 0,4 vezes quando comparados ao da cepa padrão para este mesmo gene, diferentemente do encontrado neste estudo.

A segunda maior expressão foi do gene *eec*, com o isolado R08, cujo valor de QR foi 2,8 vezes maior que o da cepa padrão. Além disso, dos cinco isolados que apresentaram expressão das EE clássica, quatro (R06, R08, R09, e R12) apresentaram valores de Ct para *eec*. Embora essa EE não esteja entre as mais implicadas em casos/surtos de intoxicação alimentar, há relatos de surtos nos quais foi causadora (KITAMOTO et al., 2009).

O gene *eeb* também foi expresso em quatro isolados (R08, R09, R11 e R12), os quais apresentaram valores de QR igual ou maior que 1, com o isolado R12 apresentando o maior valor, sendo 2,3 vezes maior que o da cepa padrão. Embora alguns surtos de intoxicação alimentar estafilocócica já tenham sido atribuídos a esta enterotoxina, como o descrito por Nema et al. (2007), não costuma ser a mais prevalente.

EEA é a enterotoxina mais envolvida em casos e surtos de intoxicação alimentar estafilocócica (ARGUDÍN et al., 2010), entretanto, neste estudo, apenas um isolado apresentou valor de Ct para essa EE (isolado R06), cujo valor encontrado para QR foi de 0,14 vezes quando comparado a cepa padrão. Esse resultado é interessante, haja vista que um estudo realizado pelo nosso grupo (dados enviados à publicação) com isolados de surtos de intoxicação alimentar estafilocócica

ocorridos no estado do Rio Grande do Sul, demonstraram que 62% dos isolados apresentaram expressão relativa para esta toxina.

Nenhum isolado apresentou valores de Ct para eee, o que corrobora dados da literatura (OSTYN et al., 2010), que destacam que o envolvimento da EEE é rara em surtos de intoxicação alimentar estafilocócica.

Outro resultado relevante observado neste estudo foi que dentre os cinco isolados que apresentaram expressão dos genes das EE clássicas, três (isolados R08, R11 e R12) expressaram duas EE em níveis superiores aos das respectivas cepas padrão. Isso demonstra seu potencial toxigênico, haja vista que pode ocorrer a produção simultânea das duas enterotoxinas, conforme 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.

5.4 Conclusão

S. aureus provenientes de carcaças de frango no sul do Rio Grande do Sul apresentam potencial toxigênico, entretanto, nem todos os isolados que portavam os genes das EE clássicas, foram capazes de expressá-los. Em todos os isolados que apresentaram expressão, houve expressão transcricional de dois ou mais genes dessas EE, sendo que três isolados apresentaram valores de QR superiores aos das cepas controle para genes de duas EE.

5.5 Referências

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, 2009.

ARGUDÍN, M. A.; MENDOZA, M. C.; RODICIO, M. R. Food Poisoning and *Staphylococcus aureus* Enterotoxins. **Toxins**. p. 1751 – 1773, 2010.

BENDAHOU, A.; ABID, M.; BOUTELDOUN, N.; CATELEJINE, D.; LEBBADI, M. Enterotoxigenic coagulase positive *Staphylococcus* in milk and milk products, Iben and jben, in northern Morocco. **The Journal of Infection Developing Countries**. v. 3, p. 169 – 176, 2009.

BRITO, M.A.V.P.; CAMPOS, G.M.M.; BRITO, J.R.F. Esquema simplificado para identificação de Estafilococos coagulase-positivos isolados de mastite bovina. **Ciência Rural**. v. 32, p. 79 – 82, 2002.

CHEN, T.R., CHIOU, C.S., TSEN, H.Y. 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.

DERZELLE, S.; DILASSER, F.; DUQUENNE, M.; DEPERROIS, V. Differential temporal expression of the staphylococcal enterotoxins genes during cell growth. **Food Microbiology**. v. 26, p. 896 – 904, 2009.

EUZÉBY, J. P. **List of Bacterial names with Standing in Nomenclature**. Disponível em: <<http://www.bacterio.cict.fr/s/staphylococcus.html>>. Acesso em: 10 mar. 2013.

FUSCO, V.; MARINA, G.; MOREA, M.; BLAIOTTA, G.; VISCONTI, A. International Journal of Food Microbiology Rapid and reliable identification of *Staphylococcus aureus* harbouring the enterotoxin gene cluster (*egc*) and quantitative detection in raw milk by real time PCR. **International Journal of Food Microbiology**. v. 144, n. 3, p. 528 – 537, 2011.

GANDRA, E. A., SILVA, J. A., MACEDO, M. R. P., ARAÚJO, M. R., MATA, M. M., SILVA, W. P. Biochemical differentiation among *S. aureus*, *S. Intermedius* and *S. hyicus* isolated from bovines with subclinical mastitis. **Archives of Veterinary Science**. v.10, n.1, p. 75 - 81, 2005.

GIEZENDANNER, N.; MEYER, B.; GORT, M.; MULLER, P.; ZWEIFEL, C. Raw milk-associated *Staphylococcus aureus* intoxication in children. **Schweizer Archiv Tierheilkunde**. v. 7, n. 151, p. 329 – 331, 2009.

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.; MOUGEL, C.; THIOULOUSE, J.; LINA, G.; MEUGNIER, H.; FOREY, F.; NESME, X.; ETIENNE, J.; VANDENESCH, F. Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, agr groups (alleles), and human disease. **Infection and Immunity**. v. 70, p. 631–641, 2002.

JOHLER, S.; STEPHAN, R. Staphylococcal food poisoning: a current review. **Archiv für Lebensmittelhygiene**. v. 61, p. 220–228, 2010.

KITAMOTO, M.; KITO, K.; NIIMI, Y.; SHODA, S.; TAKAMURA, A.; HIRAMATSU, T.; AKASHI, T.; YOKOI, Y.; HIRANO, H.; HOSOKAWA, M.; YAMAMOTO, A.; AGATA, N.; HAMAJIMA, N. Food poisoning by *Staphylococcus aureus* at a university festival. **Japanese Journal of Infectious Diseases**. v. 62, p. 242 – 243, 2009.

KLOTZ, M.; OPPER, S.; HEEG, K.; ZIMMERMANN, S. Detection of *Staphylococcus aureus* enterotoxins A to D by Real-Time Fluorescence PCR Assay. **Journal of Clinical microbiology**. v. 41, n. 10, p. 4683–4687, 2003.

KWON, N.H.; KIM, S.H.; PARK, K.T.; BAE, W.K.; KIM, J.Y.; LIM, J.Y.; AHN, J.S.; LYOO, K.S.; KIM, J.M.; JUNG, W.K.; NOH, K.M.; BOHACH, G.A.; PARK, Y.H. Application of extended single-reaction multiplex polymerase chain reaction for toxin typing of *Staphylococcus aureus* isolates in South Korea. **International Journal of Food Microbiology**. v.97. p. 137–145, 2004.

LANCETTE, G.A.; BENNETT, R.W. *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcal* Enterotoxins. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4ed. American Public Health Association (APHA), p. 387–400, 2001.

MATTHEWS, K. R., J. ROBERSON, B. E. GILLESPIE, D. A. LUTHER, S. P. OLIVER. Identification and differentiation of coagulase-negative *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction. **Journal of Food Protection**. v.60, p. 686–688, 1997.

MORANDI S., BRASCA M., LODI A R., CREMONESI P., CASTIGLIONI B. Detection of classical enterotoxins and identification of enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* from milk and dairy products. **Veterinary Microbiology**. v. 124, p. 66–72, 2007.

NÁJERA-SANCHEZ, G.; MALDONADO-RODRÍGUEZ, R.; OLVERA, P. R.; GARZA, L. M. Development of two multiplex polymerase chain reactions for the detection of enterotoxigenic strains of *Staphylococcus aureus* isolated from foods. **Journal of Food Protection**. v. 66, p. 1055-1062, 2003.

NEMA, V.; AGRAWAL, R.; KAMBOJ, D. V.; GOEL, A. K. SINGH, L. Isolation and characterization of heat resistant enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* from a food poisoning outbreak in Indian subcontinent. **International Journal of Food Microbiology**. v. 117, p. 29 – 35, 2007.

OSTYN, A.; DE BUYSER, M. L. GUILLIER, F. GROULT, J. FELIX, B. SALAH, S.; DELMAS, G. HENNEKINNE, J. A. First evidence of a food poisoning outbreak due to staphylococcal enterotoxin type E, France, 2009. **Euro Surveill** 15. 2010.

PELES, F.; WAGNER, M.; VARGA, L.; HEIN, I.; RIECK, P.; GUTSER . K.; KERESZTÚRI, P.; KARDOS, G.; TURCSÁNYI, I.; BÉRI, B.; SZABÓ, A. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine milk in Hungary. **International Journal of Food Microbiology**. v. 118, p. 186–193, 2007.

RALL, V. L. M.; VIEIRA, F. P.; RALL, R.; VIEITIS, R. L.; FERNANDES, A.; CANDEIAS, J. M. G.; CARDOSO, K. F. G.; ARAÚJO, J. P. PCR detection of staphylococcal enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw and pasteurized milk. **Veterinary Microbiology**. v. 132, p. 408 – 413, 2008.

ROSEC, J.P., GIGAUD, O. Staphylococcal enterotoxin genes of classical and new types detected by PCR in France. **International Journal of Food Microbiology**. v. 77, p. 61-70, 2002.

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, E. R.; CARMO, L. S.; SILVA, N. Detection of the enterotoxins A, B and C genes in *Staphylococcus aureus* from goat and bovine mastitis in Brazilian dairy herds. **Veterinary Microbiology**. v. 106, p. 103-107, 2005.

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.

VALASEK, M. A.; REPA J. J. The power of real-time PCR. **Advances in Physiology Education**. v. 29, n. 3, p. 151-159, 2005.

WALLIN-CARLQUIST, N.; et al. Prolonged expression and production of *Staphylococcus aureus* enterotoxin A in processed pork meat. **International Journal of Food Microbiology**. v. 141, p. 69–74, 2010.

YUAN, J. S.; ANN REED, A.; CHEN, F; STEWART C. N. Statistical analysis of real-time PCR data. **BMC Bioinformatics**. p. 1 – 12, 2006.

ZOCHE, F.; FRANÇA, R. C.; ALEIXO, J. A. G.; MOREIRA, A. N.; SILVA, W. P. PCR multiplex para detecção de *Staphylococcus aureus* enterotoxigênicos isolados de alimentos de origem animal no sul do Rio Grande do Sul, Brasil. **Interciencia**. v. 34, n. 7, p. 487-491, 2009.

6 Artigo 3: Efeito da temperatura e da concentração salina sobre os níveis de expressão transcricional dos genes das enterotoxinas estafilocócicas clássicas de *S. aureus* isolados de carcaça de frango.

Efeito da temperatura e da concentração salina sobre os níveis de expressão transcricional dos genes das enterotoxinas estafilocócicas clássicas de *S. aureus*.

BASTOS, Caroline Peixoto¹; SILVA, Wladimir Padilha da²

Resumo

A intoxicação alimentar estafilocócica é uma das doenças de origem alimentar mais comuns e resulta da ingestão de enterotoxinas estafilocócicas (EE) pré-formadas no alimento. Até o momento, já foram descritas e purificadas dez EE envolvidas com intoxicação alimentar, no entanto, aproximadamente 95% dos surtos desta doença estão associados às EE clássicas (EEA, EEB, EEC, EED e EEE). Estas EE são resistentes a determinadas condições ambientais adversas. Sendo assim, este trabalho teve por objetivo verificar os efeitos da temperatura (8° e 12°C) e da concentração salina (2,5% NaCl) sobre os níveis de expressão transcricional dos genes das EE clássicas de *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) através da análise do mRNA. Foram utilizados cinco isolados de *S. aureus*, provenientes de alimentos, avaliando-se a expressão relativa por PCR em tempo real (qPCR). Foram utilizados 4 tratamentos: 1) nas condições ideais de multiplicação de *S. aureus*; 2) em concentração salina de 2,5% de NaCl; 3) com incubação em temperatura de 12°C e; 4) com incubação em temperatura de 8°C. A concentração salina e as baixas temperaturas interferem na expressão dos genes das EE clássicas, diminuindo seus valores, entretanto, mesmo em concentração salina de 2,5% e em temperatura de 12°C os isolados expressaram os genes de EE clássicas, demonstrando seu potencial toxigênico. Temperaturas de 8°C mostraram-se mais eficientes no controle da expressão gênica das EE clássicas de *S. aureus*.

Palavras-chave: Expressão gênica. Enterotoxina estafilocócica clássica.

Staphylococcus aureus. qPCR. Temperatura. Concentração salina

¹Química de Alimentos, M. Sc., Doutoranda do Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos - Laboratório de Microbiologia de Alimentos – DCTA - FAEM – UFPel. campus universitário s/n – caixa postal 354 – 96010000 – Pelotas – RS, Brasil. Telefone: 55(53)32757258 ramal 202. Email: carolpebastos@yahoo.com.br

²Médico Veterinário, Professor, Dr, Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos – Laboratório de Microbiologia de Alimentos - DCTA - FAEM – UFPel. campus universitário s/n – caixa postal 354 – 96010000 – Pelotas – RS, Brasil. Telefone: 55(53)32757258 ramal 203. Email: silvawp@ufpel.edu.br

Abstract

Staphylococcal food poisoning is one of the most common illnesses of food origin and it is the result of staphylococcal enterotoxins (SE) pre-formed in the food. Up to now, it has been described and purified ten SE involved with food intoxication, nevertheless, nearly 95% of the outbreaks of this illness are associated to classic SE (SEA, SEB, SEC, SED and SEE). These SE are resistant to certain unfavorable environmental conditions. Thus, this study aims at verifying the effects of temperature (8° and 12° C) and saline concentration (2,5% NaCl) in the levels of transcriptional expression of genes of classic SE *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) through mRNA analysis. It has been used five isolated, food originated, evaluating the relative expression by PCR real time (qPCR). It has been used 4 treatments: 1) in ideal *S. aureus* multiplication; 2) in saline concentration of 2,5 of NaCl; 3) with incubation temperature of 12°C and; 4) with incubation in temperature of 8°C. The saline concentration and the low temperatures interfere in the expressions of genes of classic SE diminishing their values, nevertheless, even in saline concentration of 2,5 and in temperature of 12°C the isolated have expressed the genes of classic SE, demonstrating their toxigenic potential. Temperatures of 8°C have shown to be more efficient in the control of gene expression of *S. aureus* classic SE.

Keywords: Gene expression. Classic staphylococcal enterotoxins. *Staphylococcus aureus*. qPCR. Temperature. Saline concentration

6.1 Introdução

A intoxicação alimentar estafilocócica é causada pela ingestão de uma ou mais enterotoxinas estafilocócicas (EE), normalmente produzidas pela espécie *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) (PAULIN et al., 2012). Os sintomas mais comuns relacionados a esta intoxicação são náuseas, vômito, diarreia e cólicas abdominais, que costumam ser auto limitantes, começando entre 1 e 6 horas após a ingestão do alimento e durando de 1 a 3 dias, normalmente sem necessidade de internação ou tratamento (BERGDOLL e WONG, 2006). As EE são resistentes a diversas condições ambientais, tais como secagem, tratamento térmico, congelamento, pH baixo, as quais, destroem ou paralisam a multiplicação do micro-organismo produtor destas enterotoxinas (FRANCO e LANDGRAFF, 2002).

S. aureus podem crescer em uma ampla faixa de temperatura (entre 7 e 48°C), sendo a ótima em torno de 37°C, e em concentrações salinas de até 10%, no entanto, só se multiplica nas condições extremas, se todos os outros parâmetros estiverem ótimos (HENNEKINNE et al., 2012). Para que o micro-organismo consiga produzir as EE é necessário temperatura entre 10 e 45°C, sendo 35 e 40°C a faixa ótima para produção de EE. A concentração salina também interfere na produção de EE, podendo variar de 0 a 10%, sendo o ótimo para produção de EE entre 0 e 0,5% (PAULIN et al., 2012; ICMSF, 1996).

Vinte e duas EE foram descritas e 10 já foram associadas a intoxicações alimentares (EEA, EEB, EEC1, EEC2, EEC3, EED, EEE, EEG, EEH e EEI) (CENCIGOGA et al., 2003), sendo que as EE clássicas (EEA, EEB, EEC, EED e EEE) são as mais estudadas e responsáveis por, aproximadamente, 95% dos casos e surtos (AL-TARAZI et al., 2009, JOHLER e STEPHAN, 2010, WALLIN-CARLQUIST et al., 2010).

A simples presença dos genes de EE em isolados de *S. aureus* não é indicativa de que a toxina esteja sendo produzida (MORANDI et al., 2007), sendo importante verificar se esses genes estão sendo expressos nas condições de multiplicação do micro-organismo. A análise do mRNA permite essa avaliação, haja vista que, a quantidade de transcritos de mRNA é correlacionada com a quantidade de EE produzida (JOHLER e STEPHAN, 2010).

Para verificar a expressão dos genes das EE através da análise do mRNA a técnica de PCR em tempo real (qPCR) pode ser utilizada. Esta técnica monitora o progresso da amplificação de cDNA em tempo real, sendo um dos métodos quantitativos mais sensíveis e confiáveis, permitindo detectar e quantificar quantidades muito pequenas de sequências específicas de ácidos nucleicos (VALASEK e REPA, 2005, YUAN et al., 2006). Devido à precisão e sensibilidade da qPCR, mesmo mudanças muito pequenas na expressão gênica podem ser detectadas, sendo uma valiosa ferramenta no controle da expressão de genes sob diferentes condições de multiplicação (VALASEK e REPA, 2005; JOHLER e STEPHAN, 2010). Dessa forma, este trabalho teve como objetivo verificar os efeitos da temperatura (8°C e 12°C) e da concentração salina (2,5% NaCl) sobre os níveis de expressão transcricional dos genes das EE clássicas em *S. aureus* através da análise do mRNA.

6.2 Material e métodos

6.2.1 Isolamento e identificação de *S. aureus*

O isolamento e a identificação dos isolados de *S. aureus* foram realizados de acordo com Lancette e Bennett (2001), entre os anos de 2004 e 2010, na cidade de Pelotas, Rio Grande do Sul (RS). Foram utilizados 30 isolados provenientes de alimentos e cepas de padrão de *S. aureus*, FRI S6, carreadora dos genes *eea* e *eeb*, FRI 361 carreadora dos genes *eec* e *eed*, e FRI 326 carreadora do gene *eee*, pertencentes ao Banco de Cepas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos do DCTA/FAEM, da Universidade Federal de Pelotas (UFPEl). Todos os isolados e as cepas padrão passaram por testes bioquímicos adicionais como os de avaliação da resistência à acriflavina e de produção de catalase, conforme descrito por Brito et al. (2002) e Gandra et al. (2005), e mantidos em ágar Conservação, até o momento do uso.

6.2.2 Expressão dos genes das EE clássicas por PCR em tempo real sob diferentes condições de crescimento

Dos 30 isolados utilizados no isolamento e identificação, 12 isolados portavam os genes das EE clássicas, sendo que em apenas cinco observou-se expressão transcricional desses genes (dados não mostrados). Devido a isso, a verificação da expressão gênica sob diferentes condições de crescimento foi realizada com estes cinco isolados.

Primeiramente foi feita uma extração do RNA total onde as células bacterianas foram inoculadas em ágar Trypticase de Soja (TSA, Merck[®]) e incubadas a 37°C. Após 24 horas, uma colônia isolada foi retirada do TSA e inoculada em caldo Brain Heart Infusion (BHI, Merck[®]). Quatro diferentes tratamentos foram realizados nesta etapa: o primeiro, nas condições ideais de multiplicação de *S. aureus*, onde os isolados foram incubados a 37°C por 24 horas em BHI; o segundo, onde foi adicionado 2,5% de NaCl (Acumedia[®]) ao BHI e incubou-se a 37°C por 24 horas; e o terceiro e quarto tratamentos, onde incubou-se os isolados a 12 e 8°C respectivamente, em BHI, por 24 horas. Além dos isolados de alimento, as cepas

padrão também foram submetidas aos mesmos tratamentos. Posteriormente, o RNA foi extraído e purificado com o RiboPure™-Bacteria Kit (Ambion®) de acordo com o protocolo comercial. A qualidade dos RNAs foi verificada em gel de agarose a 1,5% (m/v). A síntese de cDNA foi realizada com o High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems®), de acordo com as instruções do fabricante.

A avaliação por qPCR foi realizada em aparelho 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems™). A qPCR constou de 12,5µL de SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems™), 2µL do cDNA (diluído 5 vezes), 100pMol.uL⁻¹ de *primers forward* e *reverse*, e água livre de nuclease em um volume total de 25µL. As amostras foram colocadas, em triplicata, em placas com capacidade para 96 reações, e cobertas com adesivo ótico. Os parâmetros de temperatura para a qPCR foram: 50°C/2min; desnaturação inicial a 95°C/10min, 40 ciclos de três etapas: desnaturação a 95°C/15seg; anelamento a 60°C/1min e; extensão 72°C/1min, a qual foi seguida pela curva padrão de dissociação, para verificar a especificidade dos *primers* utilizados. A eficiência de cada par de *primers* foi calculada utilizando-se a curva padrão de diluição seriada, como descrito no protocolo da Applied Biosystems™. O nível de expressão gênica foi calculada baseada no *threshold cycle* (Ct), onde o gene 16S rRNA foi utilizado como normalizador (padrão interno) e os genes de cada uma das EE, como os calibradores. Calculou-se o $\Delta\Delta CT$ que foi utilizado na equação de quantificação relativa para expressar os dados (YUAN et al., 2006):

$QR=2^{-\Delta\Delta CT}$, no qual QR (Quantificação Relativa) representa o nível de expressão gênica.

Os *primers* utilizados na qPCR estão descritos na Tabela 1, assim como o produto de amplificação e o gene alvo.

Tabela 1 – Oligonucleotídeos utilizados para quantificação das enterotoxinas clássicas por qPCR.

Oligonucleotídeos	Sequência 5' - 3'	Produto de amplificação (pb)	Alvo	Referência
EEAR1	AAAATACAGTACCTTTGGAAACGGTT	92	<i>eea</i>	Klotz, et al. 2003
EEAR2	TTTCCTGTAATAACGTCTTGCTTGA			
EEBR1	ACACCCAACGTTTTAGCAGAGAG	81	<i>eeb</i>	Klotz, et al. 2003
EEBR2	CCATCAAACCAGTGAATTTACTCG			
EECR1	AATAAAACGGTTGATTCTAAAAGTGTGAA	80	<i>eec</i>	Klotz, et al. 2003
EECR2	ATCAAAATCGGATTAACATTATCCATTC			
EEDR1	TGATTCTTCTGATGGGTCTAAAGTCTC	115	<i>eed</i>	Klotz, et al. 2003
EEDR2	GAAGGTGCTCTGTGGATAATGTTTT			
EEER1	TCAATGTGCTGGAGGCACACCAA	51	<i>eee</i>	Este estudo
EEER2	ACACCCCGTACATACATGCTGTT			
16SR1	AAGTCCCGCAACGAGCGCAA	86	16S rRNA	Este estudo
16SR2	CCTCCGGTTTGTACCCGGCA			

6.3 Resultados e discussão

6.3.1 Expressão dos genes das enterotoxinas clássicas de *S. aureus* por PCR em tempo real (qPCR)

A QR da expressão das EE clássicas de cada isolado proveniente de alimentos bem como das cepas padrão sob diferentes condições de multiplicação foi comparada com a expressão dos genes das EE clássicas de cepas padrão incubadas sob condições ideais, cuja QR = 1.

Dos quatro tratamentos utilizados, os maiores níveis de expressão dos genes das EE clássicas foram verificados no tratamento 1, no qual os isolados foram mantidos em condições ideais de multiplicação de *S. aureus*. Dos 5 isolados testados por qPCR nestas condições, todos apresentaram valores de quantificação relativa (QR) para, pelo menos, duas das EE clássicas.

Observa-se (Fig. 1), que os cinco isolados apresentaram expressão transcricional maior que a da cepa padrão, para pelo menos um dos genes das EE clássicas.

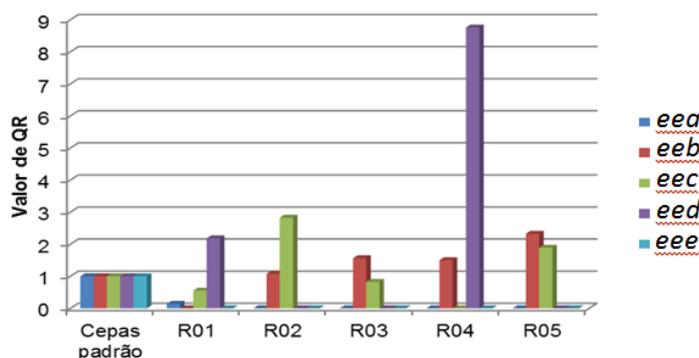


Figura 1: Expressão transcricional dos genes das enterotoxinas clássicas em cepas padrão de *S. aureus* em comparação com 5 isolados provenientes de alimentos (isolados R01, R02, R03, R04 e R05).

Verifica-se que sob condições ótimas de multiplicação o gene *eed*, no isolado R04, foi o que apresentou o maior nível de expressão, sendo 8,75 vezes maior que o da cepa padrão para este mesmo gene. Dois isolados (R01 e R04) apresentaram valores de Ct para o gene *eed*, no entanto, os valores de QR foram altos quando comparados ao da cepa padrão, destacando o potencial de toxigenicidade desses dois isolados, aliado ao fato que essa EE, juntamente com a EEA, são as mais implicadas em surtos de intoxicação alimentar estafilocócica no mundo (ARGUDÍN et al., 2010). Neste estudo, um isolado apresentou valor de Ct para *eea* (isolado R01), cujo valor encontrado para QR foi de 0,14 vezes o da cepa padrão, valor considerado baixo se comparado aos estudos realizados pelo nosso grupo (dados enviados à publicação) com isolados de surtos de intoxicação alimentar estafilocócica ocorridos no estado do Rio Grande do Sul, onde os valores de expressão encontrados para *eea* foram entre 1 e 10 vezes o valor da cepa padrão.

De acordo com Derzelle et al. (2009), o nível de expressão dos genes das EE clássicas é distinto entre si, com *eeb* e *eec* sendo expressos 10 vezes mais que *eea*, *eed* e *eee*. Neste estudo, o gene *eec* apresentou a segunda maior expressão, no isolado R02, cujo valor de QR foi 2,8 vezes maior que o da cepa padrão. Além disso, dos cinco isolados que apresentaram expressão das EE clássica, quatro apresentaram valores de Ct para *eec*. Embora essa EE não esteja entre as mais implicadas em casos/surtos de intoxicação alimentar, há relatos de surtos nos quais foi causadora (KITAMOTO et al., 2009).

O gene *eeb* também foi expresso em quatro isolados, os quais apresentaram valores de QR igual ou maior que 1, com o isolado R05 apresentando o maior valor, sendo 2,3 vezes maior que o da cepa padrão. Embora alguns surtos de intoxicação

alimentar estafilocócica já tenham sido atribuídos a esta enterotoxina, como o descrito por Nema et al. (2007), esta não costuma ser a mais prevalente.

Ostyn et al. (2010) relata que o envolvimento da EEE é rara em surtos de intoxicação alimentar estafilocócica, o mesmo foi verificado neste estudo, onde nenhum isolado apresentou valores de Ct para *eee*.

A concentração bacteriana para produção de EE é em torno de $10^5 - 10^6 \text{UFC.g}^{-1}$ (PAULIN et al., 2012), o que ocorre mais facilmente nas condições ideais de multiplicação microbiana. No entanto, a produção de EE não depende somente da concentração bacteriana, pois determinados fatores extrínsecos e intrínsecos também afetam sua produção e de forma diferente para cada EE (HENNEKINNE et al. 2012). A atividade de água (A_w), por exemplo, que pode ser modificada através da concentração salina, não interfere muito na produção da EEA e EED, desde que todas as outras condições de multiplicação sejam ótimas (HENNEKINNE et al., 2012). Observa-se, na Figura 2, que quando foi adicionado 2,5% de NaCl ao meio de cultura, as cepas padrão apresentaram diminuição no valor de QR, quando comparadas com sua multiplicação em condições ideais.

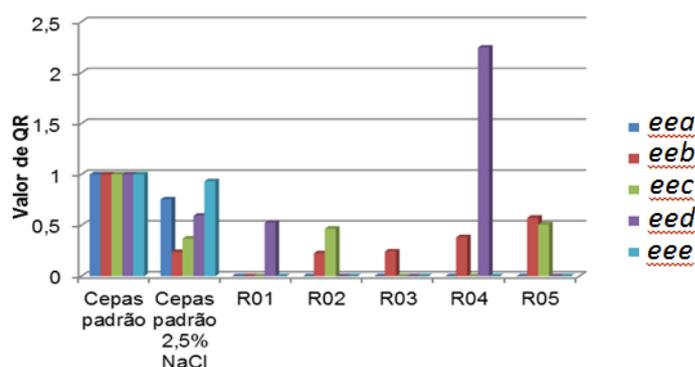


Figura 2: Expressão transcricional dos genes das enterotoxinas clássicas em cepas padrão de *S. aureus* sob condições ideais de multiplicação em comparação com 5 isolados provenientes de alimentos (R01, R02, R03, R04 e R05) e com cepas padrão com multiplicação em meio de cultura modificado pela adição de 2,5% de NaCl.

Nas cepas padrão, os genes *eea*, *eed* e *eee* apresentaram valores de QR de 0,75, 0,6 e 0,93, respectivamente, e foram os que apresentaram menor redução no valor de QR, quando comparados a estes mesmos genes de EE nas cepas padrão com crescimento sob condições ideais. Embora *S. aureus* resista a elevadas concentrações salinas, sua multiplicação é diminuída, alterando, portanto, a produção de EE. No entanto, a produção da EEA e EED pode ocorrer com uma concentração bacteriana mais baixa quando comparada aos outros tipos de EE

(BERGDOLL e WONG, 2002), o que pode explicar o fato dos genes *eea* e *eed* terem apresentado menor redução no valor de sua expressão transcricional quando comparados a *eeb* e *eec*.

Os genes *eeb* e *eec* foram os que apresentaram maior redução no valor de QR nas cepas padrão, com valores de 0,24 e 0,37, respectivamente. Hennekinne et al. (2012) e Paulin et al. (2012), relatam que a EEB é muito sensível à reduções na atividade de água e praticamente não é produzida em A_w 0,93. Segundo Genigeorgis et al. (1971), o efeito do NaCl sobre a produção de enterotoxina C segue o mesmo padrão que sobre a produção de enterotoxina B e, a medida que a concentração de NaCl aumenta de 0 para 10%, o rendimento de enterotoxina B e C diminuiu para valores indetectáveis.

Assim como os genes das EE clássicas das cepas padrão apresentaram, os cinco isolados de alimentos também apresentaram diminuição nos níveis de expressão transcricional quando submetidos a crescimento com 2,5% de NaCl. Alguns isolados deixaram de expressar genes de EE, como o isolado R01, para *eea* e *eec* e o isolado R03 para *eec*.

Ressalta-se que o isolado R04, mesmo em condições de estresse osmótico, apresentou valor de QR para o gene da *eed*, de 2,25 vezes o da cepa padrão com crescimento em condições ótimas, demonstrando que mesmo nessa condição, esse isolado pode expressar seu potencial toxigênico.

Embora Hennekinne et al. (2012) e Paulin et al. (2012) descrevam que a produção da EEB é mais afetada pela redução na atividade de água que a de EEA e EED, neste estudo, pode-se observar que todos os isolados provenientes de alimentos apresentaram redução no valor de QR das EE clássicas de 4 a 6 vezes, portanto, não foi possível observar diferença na expressão entre os genes destas enterotoxinas.

Outro fator que tem grande influência sobre a produção de EE é a temperatura. Hennekinne et al. (2012), avaliaram 77 *S. aureus* isolados de diferentes alimentos, e verificaram que as temperaturas mínimas para a produção de EE variaram bastante, ficando entre 15 e 38°C onde, para os limites mais baixos de temperatura, pequenas quantidades de toxina, foram observadas, somente após 3 a 4 dias. No entanto, neste estudo, quando os isolados de alimentos e as cepas padrão foram submetidos a temperatura de 12°C por 24 horas, foram observados valores de QR para as diferentes EE clássicas (Fig. 3).

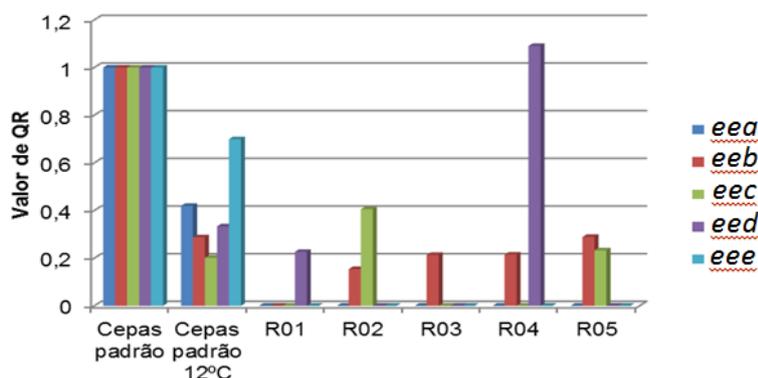


Figura 3: Expressão transcricional dos genes das enterotoxinas clássicas em cepas padrão de *S. aureus* sob condições ideais de crescimento em comparação com 5 isolados de *S. aureus* provenientes de alimentos representados por (R01, R02, R03, R04 e R05) e com cepas padrão com multiplicação a 12°C/24horas.

Assim como em condições de estresse osmótico a 2,5% de NaCl, as cepas padrão apresentaram diminuição nos valores de QR quando submetidas a baixas temperaturas, sendo que os genes *eeb* e *eec*, novamente, foram os que apresentaram maior decréscimo quando comparados aos demais. Todos os genes das EE clássicas das cepas padrão, com exceção do gene *eeb*, tiveram seus níveis de expressão transcricional mais afetados pelas baixas temperaturas do que pela concentração salina, entretanto, o gene *eee* foi o que apresentou menor redução na sua expressão, tanto com a modificação na concentração salina quanto com a temperatura de 12°C.

Os isolados de alimentos apresentaram uma redução de 7 a 9 vezes no valor de QR quando comparados as cepas padrão em condições ótimas. Mesmo com essa diminuição nos níveis de expressão transcricional, pode-se observar que pode haver produção de EE mesmo em temperaturas baixas. Dois isolados deixaram de apresentar valores de QR para alguns genes de EE, como o isolado R01, para *eea* e *eec* e o isolado R03 para *eec*.

Paulin et al. (2012) relatam produção de EE pelos isolados de *S. aureus*, após incubação, por 5 dias, em caldo BHI, a 10,8°C. A produção de EE a 10°C também foi relatada por Tatini (1973), no entanto este não indica as condições do experimento.

Não foram encontrados registros na literatura com produção de EE a temperatura de 8°C. No entanto, neste estudo, foi verificado um baixo nível de expressão transcricional para dois genes de EE (*eec* e *eed*) (Fig. 4).

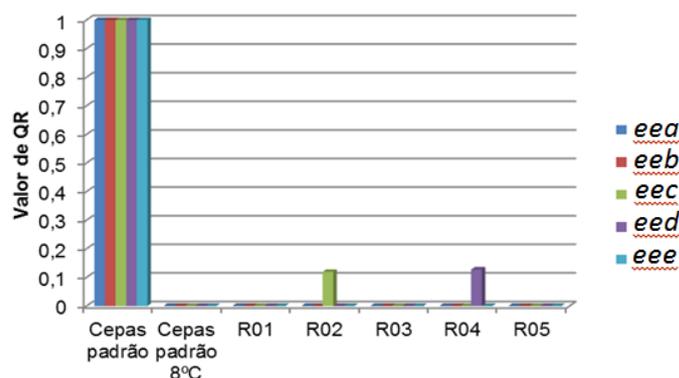


Figura 4: Expressão transcricional dos genes das enterotoxinas clássicas em cepas padrão de *S. aureus* sob condições ideais de crescimento em comparação com 5 isolados de *S. aureus* provenientes de alimentos (R01, R02, R03, R04 e R05) e com cepas padrão com multiplicação a 8°C/24horas.

Nenhum gene das EE clássicas apresentou expressão transcricional quando as cepas padrão de *S. aureus* foram incubadas a 8°C. No entanto, os isolados R02 e R04 apresentaram valores de QR de 0,12 e 0,13 para os genes *eec* e *eed* respectivamente. Embora que sejam valores baixos, este resultado é preocupante, uma vez que, mesmo em temperatura de refrigeração, esses isolados já apresentam potencial toxigênico. Em contraponto, Paulin et al., (2012), relataram que não houve produção de EE após 10 dias de incubação em caldo BHI a temperatura de 8,7°C.

6.4 Conclusão

A concentração salina e as baixas temperaturas interferem na expressão dos genes das EE clássicas, diminuindo seus valores, entretanto, a temperatura de 12°C e concentração salina de 2,5% permitiram aos isolados apresentarem potencial toxigênico. Temperaturas de crescimento de 8°C mostraram-se mais eficientes na diminuição dos valores de expressão gênica.

6.5 Referências

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, 2009.

ARGUDÍN, M. A.; MENDOZA, M. C.; RODICIO, M. R. Food Poisoning and *Staphylococcus aureus* Enterotoxins. **Toxins**. p. 1751 – 1773, 2010.

BERGDOLL, M. S.; WONG, A. C. L. Staphylococcal intoxications. **Foodborne Infections and Intoxications**. p. 523 – 562, 2006.

BRITO, M.A.V.P.; CAMPOS, G.M.M.; BRITO, J.R.F. Esquema simplificado para identificação de Estafilococos coagulase-positivos isolados de mastite bovina. **Ciência Rural**. v. 32, p. 79 – 82, 2002.

CENCI-GOGA, B.T., KARAMA, M., ROSSITTO, P.V., MORGANTE, R.A., CULLOR, J.S. Enterotoxin production by *Staphylococcus aureus* isolated from mastitic cows. **Journal of Food Protection**. v. 66, p.1693-1696, 2003.

CHEN, T.R., CHIOU, C.S., TSEN, H.Y. 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.

DERZELLE, S.; DILASSER, F.; DUQUENNE, M.; DEPERROIS, V. Differential temporal expression of the staphylococcal enterotoxins genes during cell growth. **Food Microbiology**. v. 26, p. 896 – 904, 2009.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. 2 ed. São Paulo: Editora Atheneu, p. 184, 2002.

GANDRA, E. A., SILVA, J. A., MACEDO, M. R. P., ARAÚJO, M. R., MATA, M. M., SILVA, W. P. Biochemical differentiation among *S. aureus*, *S. Intermedius* and *S. hyicus* isolated from bovines with subclinical mastitis. **Archives of Veterinary Science**. v.10, n.1, p. 75 - 81, 2005.

GENIGEORGIS, C.; FODA, M. S.; MANTIS, A.; SADLER, W.W. Effect of Sodium Chloride and pH on Enterotoxin C Production. **Applied Microbiology**. v.21, n.5, p. 862 – 866, 1971.

HENNEKINNE, J. A.; Buyser, M. L.; Dragacci, S. *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. **FEMS Microbiology Reviews**. v.36, p. 815 – 836, 2012.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS (ICMSF). *Staphylococcus aureus*. Microorganisms in food 5: characterization of microbial pathogens. 1996. v. 5, chap. 17, p. 299 – 333.

JOHLER, S.; STEPHAN, R. Staphylococcal food poisoning: a current review. **Archiv für Lebensmittelhygiene**. v. 61, p. 220-228, 2010.

JØRGENSEN H. J., MATHISEN T., LØVSETH 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**. p. 267 – 272, 2005.

KITAMOTO, M.; KITO, K.; NIIMI, Y.; SHODA, S.; TAKAMURA, A.; HIRAMATSU, T.; AKASHI, T.; YOKOI, Y.; HIRANO, H.; HOSOKAWA, M.; YAMAMOTO, A.; AGATA, N.; HAMAJIMA, N. Food poisoning by *Staphylococcus aureus* at a university festival. **Japanese Journal of Infectious Diseases**. v. 62, p. 242 – 243, 2009.

KLOTZ, M.; OPPER, S.; HEEG, K.; ZIMMERMANN, S. Detection of *Staphylococcus aureus* enterotoxins A to D by Real-Time Fluorescence PCR Assay. **Journal of Clinical microbiology**. v. 41, n. 10, p. 4683–4687, 2003.

LANCETTE, G.A.; BENNETT, R.W. *Staphylococcus aureus* and Staphylococcal Enterotoxins. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4ed. American Public Health Association (APHA), p. 387-400, 2001.

NEMA, V.; AGRAWAL, R.; KAMBOJ, D. V.; GOEL, A. K. SINGH, L. Isolation and characterization of heat resistant enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* from a food poisoning outbreak in Indian subcontinent. **International Journal of Food Microbiology**. v. 117, p. 29 – 35, 2007.

OSTYN, A.; DE BUYSER, M. L. GUILLIER, F. GROULT, J. FELIX, B. SALAH, S.; DELMAS, G. HENNEKINNE, J. A. First evidence of a food poisoning outbreak due to staphylococcal enterotoxin type E, France, 2009. **Euro Surveill** 15. 2010.

PAULIN, S.; HORN, B.; HUDSON, J. A. Factors influencing staphylococcal enterotoxin production in Dairy Products. **Manual Prepared for the Ministry for Primary Industries**. 83p. 2012.

SILVA, E. R.; CARMO, L. S.; SILVA, N. Detection of the enterotoxins A, B and C genes in *Staphylococcus aureus* from goat and bovine mastitis in Brazilian dairy herds. **Veterinary Microbiology**. v. 106, p. 103-107, 2005.

TATINI, S. R. Influence of food environments on growth of *Staphylococcus aureus* and production of various enterotoxins. **Journal of Milk and Food Technology**. v. 36, p. 559–563, 1973.

THOTA, H.; TATINI, S. R.; BENNETT, R. W. Effects of temperature, pH and NaCl on production of staphylococcal enterotoxins E and F. **Abstracts Ann Meet American Society Microbiology**. v. 1, n.11, 1973.

VALASEK, M. A.; REPA J. J. The power of real-time PCR. **Advances in Physiology Education**. v. 29, n. 3, p. 151-159, 2005.

WALLIN-CARLQUIST, N.; MARTA, D.; BORCH, E.; RADSTROM, P. Prolonged expression and production of *Staphylococcus aureus* enterotoxin A in processed pork meat. **International Journal of Food Microbiology**. v. 141, p. 69–74, 2010.

WONG, A.C.L.; BERGDOLL, M.S. Staphylococcal food poisoning. **Foodborne Diseases**. p. 231 - 248, 2002.

YUAN, J. S.; ANN REED, A.; CHEN, F; STEWART C. N. Statistical analysis of real-time PCR data. **BMC Bioinformatics**. p. 1 – 12, 2006.

Referências

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, 2009.

ALONSO, C. E. S. **Pesquisa de Cereulida em isolados do grupo *Bacillus cereus***. 2008, 72f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa.

AMSON, G. V.; HARACEMIV, S. M. C.; MASSON, M. L. Levantamento de dados epidemiológicos relativos à ocorrências/surtos de doenças transmitidas por alimentos (dtas) no Estado do Paraná – Brasil, no período de 1978 a 2000. **Ciência e Agrotecnologia**. v. 30, n. 1139-1145, 2006.

ARGUDÍN, M. A.; MENDOZA, M. C.; RODICIO, M. R. Food Poisoning and *Staphylococcus aureus* Enterotoxins. **Toxins**. p. 1751 – 1773, 2010.

ASPERGER, H. *Staphylococcus aureus*. The significance of pathogenic microorganisms in raw milk. **International Dairy Federation**. p.24-42, 1994.

ATANASSOVA, V.; MEINDL, A.; RING, C. Prevalence of *Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxins in raw pork and uncooked smoked ham – a comparison of classical culturing detection and RFLP-PCR. **International Journal of Food Microbiology**. v.68, p.105-113, 2001.

AVENA, R. M.; BERGDOLL, M. S. Purification and some physicochemical properties of enterotoxin C, *Staphylococcus aureus* strain 361. **Biochemistry**. v.6, p.1474-1480, 1967.

BACHERT, C.; GEVAERT, P.; VAN CAUWENBERGE, P. *Staphylococcus aureus* enterotoxins: a key in airway disease? **Allergy**. v. 57, p. 480-487, 2002.

BAIRD-PARKER, A.C. The staphylococci "an introduction". **Journal of Applied Bacteriology**. p.1S-8S, 1990.

BALABAN, N.; RASOOLY, A. Staphylococcal enterotoxins. **International Journal of Food Microbiology**. v. 61, p.1-10, 2000.

BANNERMAN, T.L. *Staphylococcus*, *Micrococcus*, and other catalase-positive cocci that grow aerobically. In: MURRAY, P.R et al. (Eds.). **Manual of clinical microbiology**. Washington: American Society for Microbiology, 2003, p. 384-404.

BENNETT, R. W. Staphylococcal enterotoxin and its rapid identification in foods by enzyme-linked immunosorbent assay-based methodology. **Journal of Food Protection**. v. 68, p. 1264-1270, 2005.

BERGDOLL, M. S.; SURGALLA, M. J.; DACK, G. M. Staphylococcal enterotoxin: Identification of a specific precipitating antibody with enterotoxin neutralizing property. **Journal of Immunology**. v.83, p.334-338, 1959.

BERGDOLL, M. S.; BORJA, C. R.; AVENA, R. M. Identification of a new enterotoxin as enterotoxin C. **Journal of Bacteriology**. v.90, p.1481-1485, 1965.

BERGDOLL, M. S.; BORJA, C. R.; ROBBINS, R. N.; WEISS, K. F. Identification of enterotoxin E. **Infection and Immunity**. v.4, p.593-595, 1971.

BERGDOLL, M. S.; CRASS, B. A.; REISER, R.F.; ROBBINS, R. N.; DAVIS, J. P. A new Staphylococcal enterotoxin, enterotoxin F, associated with toxic-shock-syndrome *Staphylococcus aureus* isolates. **Lancet**. v. 2, p. 1017–1021, 1981.

BERGDOLL, M. S.; WONG, A. C. L. Staphylococcal intoxications. **Foodborne Infections and Intoxications**. p. 523 – 562, 2006.

BETLEY, M. J.; HARRIS, T. O. Staphylococcal enterotoxins: characterization and relationship between structure and emetic activity. **Food Microbiology**. v. 11, p. 109 - 121, 1994.

BRASIL. Resolução-RDC nº 12, de 02 de Janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasil, nº 7-E, p. 46-53, 10 Jan. 2001, seção I.

CARMO, L. S.; DIAS, R. S.; LINARDI, R. V.; SENA, M. J.; SANTOS, D. A.; FARIA, M. E.; PENA, E. C.; JETT, M.; HENEINE, L.G. Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in Minas cheese and raw milk in Brazil. **Food Microbiology**. v. 19. p. 9-14, 2002.

CASMAN, E. P. Further serological studies of staphylococcal enterotoxin. **Journal of Bacteriology**. v.79, p.849-856, 1960.

CASMAN, E. P.; BENNETT, R. W.; DORSEY, A. E.; ISSA, J. A. Identification of a fourth staphylococcal enterotoxin, enterotoxin D. **Journal of Bacteriology**. v. 94, p.1875-1882, 1967.

CENCI-GOGA, B.T., KARAMA, M., ROSSITTO, P.V., MORGANTE, R.A., CULLOR, J.S. Enterotoxin production by *Staphylococcus aureus* isolated from mastitic cows. **Journal of Food Protection**. v. 66, p.1693-1696, 2003.

DINGES, M.M.; ORWIN, P.M.; SCHLIEVERT, P.M. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. **Clinical Microbiology**. v. 13, p. 16–34, 2000.

EUZÉBY, J. P. **List of Bacterial names with Standing in Nomenclature**. Disponível em: <<http://www.bacterio.cict.fr/s/staphylococcus.html>>. Acesso em: 05 mai. 2013.

EVENSON, M.L.; HINDS, M.W.; BERNSTEIN, R.S. BERGDOLL, M.S. Estimation of human dose of staphylococcal enterotoxin A from a large outbreaks of staphylococcal food poisoning involving chocolate milk. **International Journal of Food Microbiology**. v. 25, p. 311-316, 1988.

FERREIRA, H. B. Organização Gênica de Procariotos. In: ZAHA, Arnaldo. **Biologia Molecular Básica**. 3.ed. Porto Alegre: Mercado Aberto, 2001. p. 64-77.

FITZGERALD, J. R.; MONDAY, S. R.; FOSTER, T. J.; BOHACH, G. A.; HARTIGAN, P. J.; MEANEY, W. J.; SMITH, C. J. Characterization of a putative pathogenicity island from bovine *Staphylococcus aureus* encoding multiple superantigens. **Journal of Bacteriology**. v.183, p.63-70, 2001.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2008. 182p.

FUEYO, J. M.; MENDOZA, M. C.; MARTÍN, M. C. Enterotoxins and toxic shock syndrome toxin in *Staphylococcus aureus* recovered from human nasal carriers and manually handled foods: epidemiological and genetic findings. **Microbes and Infection**. v. 7, p. 187-194, 2005.

GARRITY, G.M.; HOLT, J.G. The road map to the manual. In: Boone, DR, Castenholz, RW (Eds). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, New York: Berlin: Springer Verlag, 2001, v.1, p. 119-166.

GIEZENDANNER, N.; MEYER, B.; GORT, M.; MULLER, P.; ZWEIFEL, C. Raw milk-associated *Staphylococcus aureus* intoxication in children. **Schweizer Archiv Tierheilkunde**. v. 7, n. 151, p. 329 – 331, 2009.

HEID, C. A. S. J.; LIVAK, K. J.; WILLIAMS, P. M. Real time quantitative PCR. **Genome Research**. v. 6, p. 986-994, 1996.

HENNEKINNE, J. A.; Buyser, M. L.; Dragacci, S. *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. **FEMS Microbiology Reviews**. v. 36, p. 815 – 836, 2012.

HERRMANN, M. G.; DURTSCHI, J. D.; WITWER, C. T.; VOELKERDING, K. V. Expanded instrument comparison of amplicon DNA melting analysis for mutation scanning and genotyping. **Clinical Chemistry**. v. 53, p. 1544-1548, 2007.

HIGUCHI, R.; FOCKLER, C.; DOLLINGER, G.; WATSON, R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. **Biotechnology**. v. 11, p. 1026–1030, 1993.

HIROOKA, E. Y.; MULLER, E.; FREITAS, J. C. E.; VINCENTE, E.; YOSHIMOTO, Y., BERGDOLL, M.S. Enterotoxigenicity of *Staphylococcus intermedius* of canine origin. **International Journal of Food Microbiology**. v.7, p.185-191, 1988.

IHRIG, J.; LILL, R.; MÜHLENHOFF, U. Application of the DNA-specific dye EvaGreen for the routine quantification of DNA in microplates. **Analytical Biochemistry**. n. 359, p. 265-267, 2006.

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.

JAY, J. M. **Microbiologia moderna de los alimentos**. 4.ed. Zaragoza: Editorial Acribia S. A., 2002. 638 p.

JOHLER, S.; STEPHAN, R. Staphylococcal food poisoning: a current review. **Archiv für Lebensmittelhygiene**. v. 61, p. 220-228, 2010.

JØRGENSEN H. J., MATHISEN T., LØVSETH 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**. p. 267 – 272, 2005.

KLOOS, W. E.; BANNERMAN, T. L. Staphylococcus and Micrococcus. In: MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; PFALLER, M. A.; TENOVER, F. C.; YOLKEN, R. H. **Manual of Clinical Microbiology**. American Society for Microbiology. 7th. Edition. 1999. Cap.16, p.264-282.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN JR., W. C. **Diagnóstico Microbiológico**. Medsi Editora Médica e Científica Ltda., 2001.1466p.

KUBISTA, M.; ANDRADE, J. M.; BENGTSSON, M.; FOROOTAN, A.; JONÁK, J.; LIND, K.; SINDELKA, R.; SJÖBACK, R.; SJÖGREEN, B.; STRÖMBOM, L.; STÅHLBERG, A.; ZORIC, N. The real time polymerase chain reaction. **Molecular Aspects of Medicine**. v. 27, p. 95-125, 2006.

KURODA, M.; OHTA, T.; UCHIYAMA, I.; BABA, T.; YUZAWA, H.; KOBAYASHI, I.; CUI, L.; OGUCHI, A.; AOKI, K.; NAGAI, Y.; LIAN, J.; ITO, T.; KANAMORI, M.; MATSUMARU, H.; MARUYAMA, A.; MURAKAMI, H.; HOSOYAMA, A.; MIZUTANI-UI, Y.; TAKAHASHI, N. K.; SAWANO, T.; INOUE, R.; KAITO, C.; SEKIMIZU, K.; HIRAKAWA, H.; KUHARA, S.; GOTO,

S.; YABUZAKI, J.; KANEHISA, M.; YAMASHITA, A.; OSHIMA, K.; FURUYA, K.; YOSHINO, C.; SHIBA, T.; HATTORI, M.; OGASAWARA, N.; HAYASHI, H.; HIRAMATSU, K. Whole genome sequencing of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **The Lancette**. v. 357, p. 1225-1240, 2001.

KWON, N.H.; KIM, S.H.; PARK, K.T.; BAE, W.K.; KIM, J.Y.; LIM, J.Y.; AHN, J.S.; LYOO, K.S.; KIM, J.M.; JUNG, W.K.; NOH, K.M.; BOHACH, G.A.; PARK, Y.H. Application of extended single-reaction multiplex polymerase chain reaction for toxin typing of *Staphylococcus aureus* isolates in South Korea. **International Journal of Food Microbiology**. v.97. p. 137-145, 2004.

LAMPRELL, VILLARD, L.; CHAMBA, J. F.; BEUVIER, E.; BORGES, E.; MAURIN, F.; MAZEROLLES, G.; NOEL, Y.; KODJO, A. Identification and biotyping of coagulase positive staphylococci (CPS) in ripened French raw milk cheeses and their in vitro ability to produce enterotoxins. **Revue de Médecine Vétérinaire**. v. 155 p. 92-96, 2004.

LANCETTE, G. A.; BENNETT, R. W. *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcal* Enterotoxins. **Compendium of methods for themicrobiological examination of foods**. 4ed. American Public Health Association (APHA), p. 387-400, 2001.

LEBEAU, C.; VANDENESH, F.; GREENLAND, T.; NOVICK, R. P.; ETIENNE, J. Coagulase expression in *Staphylococcus aureus* is positively and negatively modulation by an agar-dependent mechanism. **Journal of Bacteriology**. v.176, p.5534-5536, 1994.

LETERTRE, C.; PERELLE, S.; DILASSER, F.; FACH, P. Detection and genotyping by real-time PCR of the staphylococcal enterotoxin genes *sea* to *sej*. **Molecular and Cellular Probes**. v. 17, p. 139-147, 2003a.

LETERTRE, C.; PERELLE, S.; DILASSER, F.; FACH, P. A. Strategy on 5' nuclease multiplex PCR to detect enterotoxin genes *sea* to *sej* of *Staphylococcus aureus*. **Molecular and Cellular Probes**. v. 17, p. 227-235, 2003b.

LETERTRE, C.; PERELLE, S.; DILASSER, F.; FACH, P. Identification of a new putative enterotoxin SEU encoded by the *egc* cluster of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Applied Microbiology**. v.95, p.38-43, 2003c.

LINA, G.; BOHACH, G. A.; NAIR, S. P.; HIRAMATSU, K.; MARCHE, E. J.; MARIUZZA, R. Standard nomenclature for the superantigens expressed by *Staphylococcus*. **The Journal of Infections Diseases**, v. 189, p. 2334-2336, 2004.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the $2^{-(\Delta\Delta C(T))}$ method. **Methods**. v. 25, p. 402-408, 2001.

LOIR, Y. L.; BARON, F.; GAUTIER, M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. **Genetics and Molecular Research**, v.2, p.63-76, 2003.

MA, H.; SHIEH, K. J.; CHEN, G.; QIAO, T.; CHUANG, M. Y. Application of Real-time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR). **The Journal of American Science**. v. 2, p. 1-15, 2006.

MACKAY, I. M.; MACKAY, J. F.; NISSEN, M. D.; SLOOTS, T. P. Real-time PCR: History and Fluorogenic Chemistries. **Microbiology**. p.1 – 40, 2007.

MEAD, P. S.; SLUTSKER, L.; DIETZ, V.; McCAIG, L. F.; BRESEE, J. S.; SHAPIRO, C.; GRIFFIN, P. M.; TAUXE, R. V. Food-related illness and death in United States. **Emerging Infections Diseases**, v.5, p. 607-625, 1999.

MUNSON, S. H.; TREMAINE, M. T.; BETLEY, M. J.; WELCH, R. A. Identification and characterization of staphylococcal enterotoxin types G and I from *Staphylococcus aureus*. **Infection and Immunity**, v. 66, p.3337-3348, 1998.

NÁJERA-SANCHEZ, G.; MALDONADO-RODRÍGUEZ, R.; OLVERA, P. R.; GARZA, L. M. Development of two multiplex polymerase chain reactions for the detection of enterotoxigenic strains of *Staphylococcus aureus* isolated from foods. **Journal of Food Protection**, v. 66, p. 1055-1062, 2003.

NEMA, V.; AGRAWAL, R.; KAMBOJ, D. V.; GOEL, A. K. SINGH, L. Isolation and characterization of heat resistant enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* from a food poisoning outbreak in Indian subcontinent. **International Journal of Food Microbiology**. v. 117, p. 29 – 35, 2007.

NEWSOME, R. L.; STEWART, C. M. **Bacteria Associated with Foddborne Diseases**. Disponível em: <<http://www.foodprocessing.com/whitepapers/2004/4.html>>. Acesso em 10 fev. 2013.

NOVAIS, C. M.; ALVES, M. P.; SILVA, F. F. PCR em tempo real. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. n.33, p. 10 – 13, 2004. Disponível em: <<http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio33/pcr.pdf>>. Acesso em 10 ago. 2012.

NOVAK, F. R. **Ocorrência de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina em leite humano ordenhado**. 1999. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

NOVICK, R. P.; SCHLIEVERT, P.; RUZIN, A. Pathogenicity and resistance islands of staphylococci. **Microbes and Infection**, v. 3, p. 585-594, 2001.

NOVICK, R. P. Mobile genetic elements and bacterial toxinoses: the superantigenencoding pathogenicity islands of *Staphylococcus aureus*. **Plasmid**, v. 49, p.93-105, 2003.

OLIVEIRA, A. R. R. **Quantificação de ADN nuclear e ADN mitocondrial por PCR em tempo real**. 2009, 131f. Dissertação (mestrado), Universidade de Lisboa – Faculdade de Ciências.

OMOE, K.; HU, D.L.; OMOE, H. T.; NAKANE, A.; SHINAGAWA, K. Identification and characterization of a new staphylococcal enterotoxin-related putative toxin encoded by two kinds of plasmids. **Infection and Immunity**, v. 71 p. 6088-6094, 2003.

OMOE, K.; HU, D.L.; OMOE, H. T.; NAKANE, A.; SHINAGAWA, K. Comprehensive analysis of classical and newly described staphylococcal superantigenic toxin genes in *Staphylococcus aureus* isolates. **FEMS Microbiology Letters**, v. 246 p. 191-198, 2005.

ORWIN, P. M.; LEUNG, D. Y.; DONAHUE, H. L.; NOVICK, R. P. SCHLIEVERT, P.M. Biochemical and biological properties of Staphylococcal enterotoxin K. **Infection and Immunity**, v. 69, p. 360-366, 2001.

ORWIN, P. M.; LEUNG, D. Y. M.; TRIPP, T. J.; BOHACH, G. A.; EARHART, C. A.; OHLENDORF, D. H.; SCHLIEVERT, P. M. Characterization of a novel staphylococcal enterotoxin-like superantigen, a member of the group V subfamily of pyrogenic toxins. **Biochemistry**, v. 41, p.14033-14040, 2002.

OSTYN, A.; DE BUYSER, M. L. GUILLIER, F. GROULT, J. FELIX, B. SALAH, S.; DELMAS, G. HENNEKINNE, J. A. First evidence of a food poisoning outbreak due to staphylococcal enterotoxin type E, France, 2009. **Euro Surveill** 15. 2010.

PAULIN, S.; HORN, B.; HUDSON, J. A. **Factors influencing staphylococcal enterotoxin production in Dairy Products**. Manual Prepared for the Ministry for Primary Industries. 2012, 83p.

PELT-VERKUIL, E.; BELKUM, A. V.; HAYS, J. P. Principles and technical aspects of PCR amplification. **Springer**. 2008, 332 p.

PEREIRA, M.A.; PEREIRA, J.L.; SERRANO, A.M.; BERGDOLL, M.S. Estafilococos: Até onde sua importância em alimentos? **Higiene Alimentar**, v.14, n.68, p.32-39, 2000.

PINCHUK, I. V.; BESWICK, E. J.; REYES, V. E. Staphylococcal enterotoxins. **Toxins**.v.2, p. 2177-2197, 2010

PROFT, T.; FRASER, J.D. Bacterial superantigens. **Clinical and Experimental Immunology**, v.133, p.299-306, 2003.

REISER, R.; ROBBINSON, R. N.; NOLETO, A. L. S.; KHOE, G. P.; BERGDOLL, M. S. Identification, purification and some physicochemical properties of staphylococcal enterotoxin C3. **Infection and Immunity**, v.45, p.625-630, 1984.

RODRIGUES, K. L.; MOREIRA, A. N.; ALMEIDA, A. T. S.; CHIOCHETTA, D.; RODRIGUES, M. J.; BROD, C. S.; CARVALHAL, J. B.; ALEIXO, J. A. G. Intoxicação estafilocócica em restaurante institucional. **Ciência Rural**, v. 34, p. 297-299, 2004.

SABEK O.; DORAK M. T.; KOTB M.; GABER A. O.; GABER L. Quantitative detection of Tcell activation markers by real-time PCR in renal transplant rejection and correlation with histopathologic evaluation. **Transplantation**. v. 74, p. 701-707, 2002.

SANTANA, E. H. W.; BELOTI, V.; ARAGON L. C.; MENDONÇA, M. B. O. C. Estafilococos em Alimentos. **Arquivos do Instituto de Biologia**. v.77, n.3, p.545-554, 2010.

SMYTH, D.S.; KENNEDY, J.; TWOHIG, J.; MIAJLOVIC, H.; BOLTON, D.; SMYTH, C. J. *Staphylococcus aureus* isolates from Irish domestic refrigerators possess novel enterotoxin and enterotoxin-like genes and are clonal in nature. **Journal of Food Protection**, v. 69, p. 508-515, 2006.

SU, Y. C.; WONG, A. C. L. Identification and purification of a new staphylococcal enterotoxin H. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, p.1438-1443, 1995.

SU, Y. C.; WONG, A. C. L. Current perspectives on detection of Staphylococcal enterotoxins. **Journal of Food Protection**, v.60, n.2, p.195-202, 1997.

SU, Y. C.; WONG, A. C. L. Production of staphylococcal enterotoxin H under controlled pH and aeration. **International Journal of Food Microbiology**, v.39, p.87-91, 1998.

THOMAS, D. Y.; JARRAUD, S.; LEMERCIER, B.; COZON, G.; ECHASSERIEAU, K.; ETIENNE, J.; GOUGEON, M.; LINA, G.; VANDENESCH, F. 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.

TRABULSI, L. R.; TEIXEIRA, L. M.; BUERIS, V. **Staphylococcus aureus**. In: TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. Microbiologia. 4.ed. São Paulo: Atheneu, 2004. p. 175-182.

TSENG, C. W.; ZHANG, S.; STEWART, G. Accessory gene regulator control of Staphylococcal enterotoxin D gene expression. **Journal of Bacteriology**. v. 186, n. 6, p. 1793 – 1801, 2004.

ULRICH, R. G.; SIDELL, S.; TAYLOR, T. J.; WILHELMSSEN, C. L.; FRANZ, D. R. Staphylococcal enterotoxin B and related pyrogenic toxins. **Medical Aspects of Chemical and Biological Warfare**, p. 621-630, 1997.

U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Center for Food Safety and Applied Nutrition. Bacterial Pathogens Growth and Inactivation**. In: Fish and fisheries products hazards and controls guidance. 3.ed. jun. 2001. Disponível em: <<http://seafood.ucdavis.edu/haccp/compendium/chapt19.htm>>. Acesso em: 15 jan. 2013.

VALASEK, M. A.; REPA J. J. The power of real-time PCR. **Advances in Physiology Education**. v. 29, n. 3, p. 151-159, 2005.

VARNAN, A.H.; EVANS, M.G. **Foodborne pathogens: an illustrated text**. London, Mosby Year Book, p. 235-265, 1991.

VERAS, J. F.; SANTOS, D.A.; CARMO, L. S.; FERNANDES, T. M. G.; AZALIM, C. C.; SILVA, M. C. C.; MARTINS, R. T.; CERQUEIRA, M. M. O. P. Levantamento de surtos de toxinfecção alimentar envolvendo leite e produtos derivados no Estado de Minas Gerais, Brasil. In: VII Congresso Brasileiro de Higienistas de alimentos e I Congresso Latino-Americano de Higienistas de Alimentos, Belo Horizonte. **Anais do...**, 2003.

VERNOZY-ROZAND, C.; MAZUY-CRUCHAUDET, C.; BABIA, C.; RICHARD, Y. Comparison of three immunological methods for detecting staphylococcal enterotoxins from food. **Letters in Applied Microbiology**, v.10, p. 1-5, 2004.

VITZTHUM, F.; GEIGER, G.; BISSWANGER, H.; BRUNNER, H.; BERNHAGEN, J.A. quantitative fluorescence-based microplate assay for the determination of double-stranded DNA using SYBR Green I and a standard ultraviolet transilluminator gel imaging system. **Analytical Biochemistry**. v. 276, p. 59 – 64, 1999.

WALLIN-CARLQUIST, N.; MARTA, D.; BORCH, E.; RADSTROM, P. Prolonged expression and production of *Staphylococcus aureus* enterotoxin A in processed pork meat. **International Journal of Food Microbiology**, v. 141, p. 69–74, 2010.

WATZINGER, F.; SUDA, M.; PREUNER, S.; BAUMGARTINGER, R.; EBNER, K.; BASKOVA, L.; NIESTERS, H. G. M.; LAWITSCHKA, A.; LION, T. Real-Time quantitative PCR assays for detection and monitoring of pathogenic human viruses in immunosuppressed pediatric patients. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 42, p 5189-5198, 2004.

WESELL, K. T. **Regulation of virulence gene expression in *Staphylococcus aureus***. 2000. 66f. Tese (Doutorado em Microbiologia). Mikrobiologiskt och Tumörbiologiskt Centrum (MTC), Karolinska Institutet, Estocolmo, Suécia.

WITTEWER, C.T.; REED, G. H.; GUNDRY, C. N.; VANDERSTEEN, J. G.; PRYOR, R. J. Highresolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen. **Molecular Diagnostics and Genetics**. v. 49, p. 853-860. 2003.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Foodborne intoxication due to *Staphylococcus aureus* in Japan**. Disponível em <<http://www.who.int/disease-outbreaknews/n2000/july>>. Acesso em 12 dez. 2012.

YARWOOD, J. M.; McCORNICK, J. K.; PAUSTIAN, M. L.; ORWIN, P. M.; KAPUR, V.; SCHLIEVERT, P. M. Characterization and expression analysis of *Staphylococcus aureus* pathogenicity island 3 – Implications for the evolution of staphylococcal pathogenicity islands. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 13138-13147, 2002.

ZHANG, S.; IANDOLO, J. J.; STEWART, G. C. The enterotoxin D plasmid of *Staphylococcus aureus* encodes a second enterotoxin determinant (*sej*). **FEMS Microbiology Letters**, v. 168, p. 227-233, 1998.

ZOCHE, F.; FRANÇA, R. C.; ALEIXO, J. A. G.; MOREIRA, A. N.; SILVA, W. P. PCR multiplex para detecção de *staphylococcus aureus* enterotoxigênicos isolados de alimentos de origem animal no sul do Rio Grande do Sul, Brasil. **Interciencia**. v. 34, n. 7, p. 487-491, 2009.

ZOLI, J.A.; NEGRETE, I.R.A.; OLIVEIRA, T.C.R.M. Avaliação da contaminação por *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* spp. de maionese de batata comercializada em Londrina, PR. **Higiene Alimentar**, v.16, n.95, p.62-70, 2002.

ZSCHÖCK, M.; BÄRBEL, K.; WOLTER, W.; HAMMAN, H. P.; LÄMMLER, C. Pattern of enterotoxin genes *seg*, *seh*, *sei* and *sej* positive *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. **Veterinary Microbiology**, v. 108, p. 243-249, 2005.