

PCR múltiple para la detección de los genes *sea*, *seb*, *sec*, *sed* y *see* de *Staphylococcus aureus*. Caracterización de aislamientos de origen alimentario

E. A. MANFREDI^{1*}, G.A. LEOTTA^{1,2}, M. RIVAS¹

¹Servicio Fisiopatogenia, Departamento Bacteriología, Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas – ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”. Av. Vélez Sarsfield 563 (1281) Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina; ²Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)

*Correspondencia. E-mail: emanfredi@anlis.gov.ar

RESUMEN

La presencia de *Staphylococcus aureus* en los alimentos representa un riesgo potencial para la salud pública; sus enterotoxinas son el principal factor de virulencia. La detección de las enterotoxinas de *S. aureus* puede realizarse por ELISA, aunque sólo es posible detectar el *pool* de enterotoxinas SEA, SEB, SEC, SED y SEE. Los objetivos del presente trabajo fueron optimizar dos técnicas de PCR múltiple para la detección de los genes *sea*, *seb*, *sec*, *sed* y *see* de *S. aureus* y caracterizar un conjunto de 115 aislamientos de *Staphylococcus* spp. asociados a intoxicaciones alimentarias provenientes de diferentes provincias de Argentina. La caracterización se realizó por pruebas bioquímicas, ELISA y PCR. Sesenta y ocho aislamientos (59,1%) fueron positivos por ELISA, mientras que 61 (53%) fueron positivos por PCR. De los aislamientos positivos por PCR, 34 (55,7%) portaron el gen *sea*, 9 (14,8%) el gen *seb*, 5 (8,1%) el gen *see*, 4 (6,5%) el gen *sec*, 6 (9,9%) los genes *sea* y *seb*, 2 (3,3%) los genes *sea* y *sec*, y 1 (1,7%) los genes *sea* y *sed*. Este es el primer estudio de caracterización genotípica de aislamientos de *S. aureus* asociados con brotes de intoxicación alimentaria registrados en distintas provincias argentinas.

Palabras clave: *Staphylococcus aureus*, enterotoxinas, caracterización, PCR, optimización

ABSTRACT

Multiplex PCR for the detection of *sea*, *seb*, *sec*, *sed* and *see* genes of *Staphylococcus aureus*. Characterization of isolates from food. The presence of *Staphylococcus aureus* in food represents a potential risk to public health, being its enterotoxins the major virulence factor. Enterotoxin detection can be determined by ELISA, but only for the pool of enterotoxins SEA, SEB, SEC, SED and SEE. The main aims of this study were to optimize two PCR techniques for detection of *S. aureus sea*, *seb*, *sec*, *sed* and *see*, and to characterize *Staphylococcus* spp. isolates associated with food intoxication. Two PCR techniques were optimized and 115 *Staphylococcus* spp. isolates from Ciudad Autónoma de Buenos Aires, and Buenos Aires, Córdoba, and Neuquén provinces were characterized. The characterization was performed by biochemical tests, ELISA and PCR. Sixty-eight isolates (59.1%) were positive by ELISA, while 61 (53%) were positive by PCR. Out of the positive PCR isolates, 34 (55.7%) carried the *sea* gene, 9 (14.8%) the *seb* gene, 5 (8.1%) the *see* gene, 4 (6.5%) the *sec* gene, 6 (9.9%) were positive for *sea* and *seb* genes, 2 (3.3%) for *sea* and *sec* genes, and 1 (1.7%) for *sea* and *sed* genes. This is the first study of genotypic characterization of *S. aureus* isolates associated with food intoxication from different provinces of Argentina.

Key words: *Staphylococcus aureus*, enterotoxins, characterization, PCR, optimization

En el siglo XXI, las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) siguen constituyendo uno de los principales problemas para la salud pública. *Staphylococcus aureus* es el agente etiológico más frecuente entre las intoxicaciones de origen alimentario (9). Su presencia en alimentos procesados se debe a la contaminación introducida por los manipuladores, por inadecuadas prácticas de manufactura o por la utilización de materia prima contaminada (4).

Uno de los principales factores de virulencia de *S. aureus* son las enterotoxinas (SE), proteínas simples, termotolerantes y de bajo peso molecular (26 000-34 000) (1). Las principales enterotoxinas detectadas en intoxi-

caciones alimentarias son SEA, SEB, SEC1, SEC2, SEC3, SED y SEE. Sin embargo, en la actualidad se reconocen 13 nuevos tipos de enterotoxinas cuya implicancia en la salud pública todavía no está totalmente dilucidada, estas son las enterotoxinas SEG, SEH, SEI, SEJ, SEK, SEL, SEM, SEN, SEO, SEP, SEQ, SER y SEU (2).

En Argentina, la detección de las enterotoxinas de *S. aureus* se realiza mediante equipos comerciales de enzimoimmunoensayo (ELISA), los que no permiten diferenciar cada una de ellas. Uno de estos equipos es automatizado y se basa en la técnica ELFA (*Enzyme Linked Fluorescent Assay*) (VIDAS, bioMérieux). El otro es manual, muy sencillo de utilizar y no requiere un equipo para

la lectura de los resultados (TECRA, 3M). Una alternativa para identificar los aislamientos de *S. aureus* potencialmente enterotoxigénicos es detectar los genes que codifican la expresión de las SE.

Los objetivos del presente trabajo fueron optimizar dos técnicas de PCR múltiple para la detección de los genes *sea*, *seb*, *sec1*, *sec2*, *sec3*, *sed* y *see* de *S. aureus* y caracterizar aislamientos de *Staphylococcus* spp. asociados a intoxicaciones alimentarias. Los 115 aislamientos que se analizaron fueron provistos por las siguientes instituciones: Agencia Córdoba Ciencia S.A.; Laboratorio Central de Salud Pública de la Provincia de Buenos Aires; Laboratorio de Microbiología de Alimentos DLIM-DGHYSA de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires; Hospital Heller de la provincia de Neuquén; Universidad Nacional de Río Cuarto; Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (UNLP-CONICET) y Universidad Nacional de Lanús.

Para realizar la caracterización fenotípica y genotípica de los aislamientos se utilizaron como controles positivos las cepas N5 (*sea*), N14 (*seb*), MC1 (*sec*), C1 (*sed*) y N19125 (*see*), provistas por la Agencia Córdoba Ciencia S.A. Como control negativo se utilizó la cepa *S. aureus* ATCC 25923.

Las cepas control y los 115 aislamientos de *Staphylococcus* spp. fueron cultivados en agar Baird Parker (Laboratorios Britania, Buenos Aires, Argentina) para evaluar la reducción de telurito y la producción de lecitinasa. Se efectuaron las pruebas de catalasa, coagulasa en tubo, DNAsa (Laboratorios Britania), producción de acetoína (caldo RM/VP, Laboratorios Britania) y reducción de nitrato [caldo cerebro corazón (CCC) 2,5% KNO₃ 0,1]. Luego se evaluó la capacidad de los aislamientos para fermentar hidratos de carbono (ICN Biomedicals Inc., Ohio, EE.UU.) al 1% en caldo base de rojo fenol (Becton

Dickinson). Los azúcares utilizados fueron trehalosa, lactosa y manosa. Finalmente, los aislamientos fueron analizados por el equipo miniVIDAS (bioMérieux, Marcy L'Étoile, Francia), una versión más compacta del equipo VIDAS antes citado que, al igual que aquél, utiliza un sustrato fluorescente (ELFA) para la detección de las toxinas SEA, SEB, SEC1, SEC2, SEC3, SED y SEE de *Staphylococcus* spp. La extracción de enterotoxinas se realizó según Gubbay *et al.* (7).

La extracción de ADN para la realización de las PCR se realizó según Leotta *et al.* (10) con algunas modificaciones. Cada aislamiento fue incubado en agar cerebro corazón (ACC) (Becton Dickinson) a 37 °C durante 24 h. Posteriormente, se incubó una colonia en 5 ml de CCC (Becton Dickinson) a 37 °C durante 24 h. De cada CCC se tomaron alícuotas de 1,5 ml en tubos Eppendorf y se centrifugó a 10 000 rpm durante 5 min. Descartado el sobrenadante, el sedimento fue resuspendido en 150 µl de buffer tritón [tritón X-100 (Merck, Darmstadt, Alemania) al 1% en buffer TE 1X (10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA pH 8)]. Después de haber sido calentados a ebullición durante 30 min, los tubos fueron centrifugados a 10 000 rpm durante 5 min. Una alícuota de 5 µl de sobrenadante fue utilizada como ADN templado. Los cebadores empleados para la detección de los genes *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see* y ADNr 16S fueron los descritos por Monday *et al.* (14) y Lovseth *et al.* (13) (Tabla 1). Se optimizaron dos técnicas de PCR: 1) para la detección de los genes *sea*, *seb* y *sec*; y 2) para la detección de los genes *see* y *sed*. En ambas PCR se incorporó un par de cebadores para amplificar el gen ADNr 16S como control interno de amplificación no competitivo (Figuras 1 y 2). La mezcla de reacción de ambas PCR contenía en un volumen final de 50 µl, 300 mM de cada uno de los cebadores para amplificar los genes codificantes de

Tabla 1. Secuencia de los cebadores utilizados en las dos técnicas de PCR para la detección de los genes *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see* y ADNr 16S de *Staphylococcus aureus*, según Lovseth A *et al.*

Cebadores	Secuencia de los cebadores (5'-3')	Tamaño del fragmento de amplificación (pb)	Genes detectados
sea F	GCA GGG AAC AGC TTT AGG C	521	<i>sea</i>
sea R	GTT CTG TAG AAG TAT GAA ACA CG		
seb-sec F	ACA TGT AAT TTT GAT ATT CGC ACT G	667	<i>seb</i>
seb R	TGC AGG CAT CAT GTC ATA CCA		
sec F	CTT GTA TGT ATG GAG GAA TAA CAA	284	<i>sec1</i> , <i>sec2</i> , <i>sec3</i>
sec R	TGC AGG CAT CAT ATC ATA CCA		
sed F	GTG GTG AAA TAG ATA GGA CTG C	385	<i>sed</i>
sed R	ATA TGA AGG TGC TCT GTG G		
see F	TAC CAA TTA ACT TGT GGA TAG AC	121	<i>see</i>
see R	CTC TTT GCA CCT TAC CGC		
ADNr 16 S F	GTA GGT GGC AAG CGT TAT CC	228	ADNr 16 S
ADNr 16 S R	CGC ACA TCA GCG TCA G		

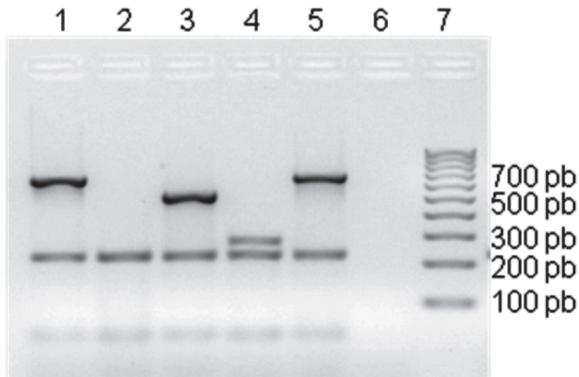


Figura 1. PCR múltiple para la detección de los genes *sea* (521 pb), *seb* (667 pb), *sec* (284 pb) y ADNr 16S (228 pb) de *Staphylococcus aureus*. Calles 1 y 2: aislamientos obtenidos de alimentos asociados a brotes de intoxicación alimentaria; calle 1: aislamiento de *S. aureus* portador del gen *seb*; calle 2: aislamiento de *S. aureus* no toxigénico. Calle 3: control positivo *sea* (N5). Calle 4: control positivo *sec* (MC1). Calle 5: control positivo *seb* (N14). Calle 6: control de reactivos. Calle 7: marcador de peso molecular Cienmarker (Biodynamics).

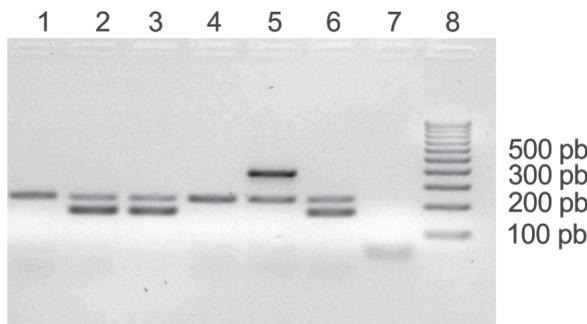


Figura 2. PCR múltiple para la amplificación de los genes *sed* (385 pb), *see* (171 pb) y ADNr 16S (228 pb) de *Staphylococcus aureus*. Calles 1 a 4: aislamientos obtenidos de alimentos asociados a brotes de intoxicación alimentaria; calles 1 y 4: aislamientos de *S. aureus* no toxigénicos; calles 2 y 3: aislamientos de *S. aureus* portadores del gen *see*. Calles 5 y 6: cepas control *sed* (C1) y *see* (N19125), respectivamente. Calle 7: control de reactivos. Calle 8: marcador de peso molecular Cienmarker (Biodynamics).

enterotoxinas y 60 mM de los cebadores para amplificar el gen ADNr 16S (Invitrogen), 400 μ M de cada dNTP (Promega, Madison, WI, EE.UU.), buffer de PCR 1X (Fermentas, California, EE.UU.), 0,4 mM $MgCl_2$ (Fermentas), 0,04 U/ μ l de *Taq* polimerasa (Fermentas) y 5 μ l de ADN muestra y de los controles correspondientes. Además, se utilizaron 50 μ l de mezcla de reacción de PCR sin ADN templado como control del sistema. Las condiciones de amplificación para ambas PCR fueron: 95 °C 5 min; 15 ciclos de 95 °C 30 s, 68 °C 30 s y 72 °C 30 s; 20 ciclos de 95 °C 30 s, 60 °C 30 s y 72 °C 30 s; y un paso de extensión final a 72 °C durante 2 min. Para la

electroforesis y adquisición de imágenes se agregaron 10 μ l de una solución de xileno-cianol 0,25% y glicerol 30% a 50 μ l del ADN amplificado; luego se sembraron 10 μ l en un gel de agarosa al 2,5% en buffer TAE 1X adicionado con 0,5 μ g/ml de bromuro de etidio. El tiempo de corrida fue de 25 min y el voltaje fue de 100 V. Se utilizó el marcador de peso molecular Cienmarker (Biodynamics S.R.L., Buenos Aires, Argentina). Para documentar los geles, se utilizó un transiluminador modelo 2000 (BioRad, Hercules, California, EE.UU.) y el sistema Olympus-5060 Wide Zoom (Melville, EE.UU.). El análisis de los geles se realizó con el programa Doc-It Image Acquisition (UVP, Inc., Upland CA, EE.UU.).

Sobre un total de 115 aislamientos de *Staphylococcus* spp. analizados, 113 fueron identificados como *S. aureus* subespecie *aureus* (98%), 11 aislamientos no utilizaron lactosa (9,7%) y 3 no utilizaron trehalosa (2,6%). Dos aislamientos fueron identificados como estafilococos coagulasa negativos. Por la técnica de enzoinmunoensayo, 68 aislamientos fueron positivos para el *pool* de enterotoxinas SEA, SEB, SEC1, SEC2, SEC3, SED y SEE (59,1%). En 61 de los 115 aislamientos analizados (53,0%) se detectó alguna de las SE buscadas: 34 (55,7%) portaron el gen *sea*, 9 (14,8%) el gen *seb*, 5 (8,1%) el gen *see* y 4 (6,5%) el gen *sec*. Asimismo, 6 (9,9%) aislamientos fueron positivos para los genes *sea* y *seb*, 2 (3,3%) para los genes *sea* y *sec* y 1 (1,7%) para los genes *sea* y *sed*. Ninguno de los dos aislamientos de estafilococos coagulasa negativos fueron positivos para las enterotoxinas buscadas.

En los últimos años se desarrollaron numerosas técnicas de PCR múltiple para la detección de los genes que codifican las enterotoxinas de *S. aureus* (5, 6, 8). Las técnicas basadas en PCR fueron utilizadas en estudios epidemiológicos (3) y en el análisis de alimentos de riesgo (15). Algunas de estas nuevas técnicas permiten detectar un mayor número de genes que codifican enterotoxinas (2) y en ellas se utilizan varios cebadores, hecho que aumenta la complejidad y el costo de la caracterización. En este trabajo se optimizaron dos técnicas de PCR múltiple para la detección de los genes *sea*, *seb*, *sec*, *sed* y *see* con el fin de caracterizar los aislamientos de *S. aureus* asociados con intoxicación alimentaria. Para ello se tuvo en cuenta que el 95% de los aislamientos provenientes de brotes de ETA producen SEA, SEB, SEC, SED y SEE o sus combinaciones, mientras que sólo el 5% restante corresponde a las nuevas toxinas (2). Es interesante mencionar que las PCR descritas en este trabajo fueron utilizadas para el estudio epidemiológico de diferentes brotes de ETA en Argentina (11, 12).

La técnica de extracción de ADN utilizada en este trabajo no es de uso frecuente. Sin embargo, se obtuvieron resultados válidos de un modo más rápido, sencillo y económico que con los métodos artesanales y comerciales (10).

En lo concerniente a las técnicas de PCR, en esta investigación se modificó la cantidad de cebadores y el tiempo de ciclado respecto de los descritos por Monday *et al.* (14). Estas modificaciones permitieron utilizar una enzima *Taq* polimerasa convencional con resultados confiables, además de reducir los costos y el tiempo para la obtención de los resultados. Se analizaron 115 aislamientos provenientes de alimentos asociados con intoxicaciones alimentarias de diferentes provincias del país y se demostró que el gen predominante fue *sea*. Este hallazgo coincide con reportes previos en los cuales se caracterizaron aislamientos de *S. aureus* vinculados con intoxicaciones alimentarias y manipuladores de alimentos (4). Al analizar los mismos aislamientos por el sistema ELFA, se observó una mayor proporción de aislamientos positivos (un 6% más) comparado con los resultados obtenidos por las técnicas de PCR. Esta diferencia puede interpretarse como un falso resultado positivo del ELISA, el cual está contemplado en los equipos comerciales. Para los fabricantes de dichos equipos, la proporción de falsos resultados positivos es del 0,4%, un valor inferior al observado en el presente trabajo. Sin embargo, debemos considerar que el valor aportado por los fabricantes fue determinado sobre productos alimenticios y no a partir de cepas aisladas.

En el presente trabajo, la caracterización fenotípica y genotípica se basó en la detección de las enterotoxinas SEA, SEB, SEC1, SEC2, SEC3, SED y SEE y de los genes que las codifican. Sin embargo, sería importante desarrollar una segunda línea de PCR para detectar los genes que codifican las nuevas enterotoxinas, a fin de conocer la incidencia de estas enterotoxinas en la ETA e investigar su relevancia en la salud pública de nuestro país.

Cabe destacar, finalmente, que este es el primer estudio de caracterización genotípica de enterotoxinas provenientes de aislamientos de *S. aureus* asociados con brotes de intoxicación alimentaria registrados en distintas provincias argentinas.

Agradecimientos: los autores agradecen la valiosa colaboración de Nancy Passalacqua (Agencia Córdoba Ciencia), Universidad Nacional de Río Cuarto, Sergio Epszteyn (Laboratorio de Microbiología de Alimentos DLIM-DGHySA, G.C.B.A.), Guillermo Guirín (Universidad Nacional de Lanús), bioMérieux por el equipo miniVIDAS y los equipos para la detección de enterotoxinas de *S. aureus*. Hospital Heller (Neuquén); Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (UNLP-CONICET).

BIBLIOGRAFÍA

1. Bergdoll MS, Huang IY, Schantz EJ. Chemistry of staphylococcal enterotoxins. *J Agric Food Chem* 1994; 22: 9-13.
2. Bhatia A, Zahoor S. *Staphylococcus aureus* enterotoxins: A review. *J Clin Diag Res* 2007; 3: 188-97.
3. Cha J, Lee J, Jung Y, Yoo J, Park Y, Kim B, *et al.* Molecular analysis of *Staphylococcus aureus* isolates associated with staphylococcal food poisoning in South Korea. *J Appl Microbiol* 2006; 101: 864-71.
4. Figueroa GG, Navarrete PW, Caro MC, Troncoso MH, Gustavo Faúndez GZ. Portación de *Staphylococcus aureus* enterotoxigénicos en manipuladores de alimentos. *Rev Med Chile* 2002; 130: 859-64.
5. Fischer A, Francois P, Holtfreter S, Broeker B, Schrenzel J. Development and evaluation of a rapid strategy to determine enterotoxin gene content in *Staphylococcus aureus*. *J Microbiol Methods* 2009; 77: 184-90.
6. Garber EA, Venkateswaran KV, O'Brien TW. Simultaneous multiplex detection and confirmation of the proteinaceous toxins abrin, ricin, botulinum toxins, and *Staphylococcus* enterotoxins A, B, and C in food. *J Agric Food Chem* 58. Disponible en: <http://www.biomedsearch.com/nih/Simultaneous-multiplex-detection-confirmation-Proteinaceous/20455521.html>
7. Gubbay L, Galanternik L, Galan G, Escobar M, Cabrera Durango J, *et al.* *Staphylococcus aureus*: capacidad enterotoxigénica y resistencia antibiótica de cepas aisladas de alimentos y manos de manipuladores. *La alimentación Latinoamericana* 2006; N 262.
8. Karahan M, Açik MN, Cetinkaya B. Investigation of toxin genes by polymerase chain reaction in *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis in Turkey. *Foodborne Pathog Dis* 2009; 6: 1029-35.
9. Le Loir Y, Baron F, Gautier M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genet Mol Res* 2003; 2: 63-76
10. Leotta GA, Chinen I, Epszteyn S, Miliwebsky E, Melamed C, Motter M, *et al.* Validación de una técnica de PCR múltiple para la detección de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga. *Rev Argent Microbiol* 2005; 37: 1-10.
11. Leotta GA, Oteiza JM, Refi MS, Manfredi E, Galli L, Deza N, *et al.* Estudio microbiológico de alimentos asociados a dos brotes de ETA en la ciudad de La Plata. III Congreso Argentino de Microbiología de Alimentos 2006.
12. López C, Feltri A, Leotta G, González G, Manfredi E, Gottardi G, *et al.* Brote de enfermedad alimentaria en la localidad de El Huecú, provincia de Neuquén. *Rev Argent Microbiol* 2008; 40: 198-203.
13. Lovseth A, Loncarevic S, Berdal K. Modified multiplex PCR methods for detection of pyrogenic exotoxin genes in staphylococcal isolates. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 3869-72.
14. Monday SR, Bohach GA. Use of multiplex PCR to detect classical and newly described pyrogenic toxin genes in staphylococcal isolates. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 3411-4.
15. Rall V, Vieira F, Rall R, Vieitis RL, Fernandes A, Candeias J, *et al.* PCR detection of staphylococcal enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw and pasteurized milk. *Vet Microbiol* 2008; 32: 408-13.