



Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães
Mestrado em Saúde Pública



ISABELLE DA SILVA LUZ

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS TOXINAS EM
Staphylococcus aureus ISOLADOS DE LEITE E QUEIJO DE
COALHO EM MUNICÍPIOS DA REGIÃO AGRESTE DE
PERNAMBUCO**

Recife

2008

Isabelle da Silva Luz

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS TOXINAS EM *Staphylococcus aureus*
ISOLADOS DE LEITE E QUEIJO DE COALHO EM MUNICÍPIOS DA REGIÃO
AGRESTE DE PERNAMBUCO**

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado
em Saúde Pública do Centro de Pesquisas
Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz,
para obtenção do grau de Mestre em Ciências

Orientadora: Dra. Tereza Cristina Leal Balbino
Co-orientadora: Dra. Nilma Cintra Leal

Recife

2008

Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

L979c Luz, Isabelle da Silva.

Caracterização molecular das toxinas em *Staphylococcus aureus* isolados de leite e queijo de coalho em municípios da Região Agreste de Pernambuco. / Isabelle da Silva Luz. — Recife: I. S. Luz, 2008.
125 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz.

Orientadora: Dra. Tereza Cristina Leal Balbino, Co-orientadora: Dra. Nilma Cintra Leal.

1. Intoxicação Alimentar Estafilocócica. 2. Coagulase. 3. *Staphylococcus aureus*. 4. Resistência Bacteriana a Drogas. I. Balbino, Tereza Cristina Leal. II. Leal, Nilma Cintra. III. Título.

CDU 613.2.099

Isabelle da Silva Luz

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS TOXINAS EM *Staphylococcus aureus*
ISOLADOS DE LEITE E QUEIJO DE COALHO EM MUNICÍPIOS DA REGIÃO
AGRESTE DE PERNAMBUCO**

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado
em Saúde Pública do Centro de Pesquisas
Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz,
para obtenção do grau de Mestre em Ciências

Aprovado em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Dra. Tereza Cristina Leal Albino
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM)

Dra. Claudia Maria Fontes de Oliveira
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM)

Dra. Márcia Maria Camargo de Moraes
Universidade de Pernambuco (UPE)

Ao meu melhor amigo, Jesus Cristo, e à minha mãe,
fundamentais para que eu continue lutando por
meus objetivos

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela presença constante na minha vida.

À minha família, em especial à minha mãe, pelo amor, compreensão e apoio em todos os momentos.

Ao meu querido William que mesmo à distância sempre esteve ao meu lado me apoiando nos momentos mais difíceis.

À Dra. Tereza Cristina, pela orientação, paciência, amizade e experiência profissional transmitida.

À Dra. Nilma, pela co-orientação.

À aluna de graduação, Ana Paula Freire, pela ajuda na realização dos experimentos.

A todos do departamento de Microbiologia (em especial Ana Paula Costa, Cariri, Christian, Cláudio, Isaac, José Ronnie, Larissa, Marília, Mariana Marques, Rodrigo, Silvana, Vladimir, Wagner e Wellington).

À Dra. Yara Gomes, pela compreensão.

À Dra. Regina Bressan, pelas palavras de incentivo.

À Dra. Márcia Morais, pelo estágio de Ensino e Docência.

A Marcelo Paiva do Departamento de Entomologia do CPqAM.

Aos departamentos de Microbiologia e Saúde Coletiva do CPqAM pelo suporte técnico e científico.

Aos funcionários da Secretaria Acadêmica e da biblioteca do CPqAM.

A todos os membros da banca examinadora, por aceitarem contribuir com este trabalho.

Ao Banco do Nordeste do Brasil e PAPES IV/ FIOCRUZ pelo financiamento do projeto.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela bolsa de mestrado concedida.

*“Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa,
nunca tem medo e nunca se arrepende”*

Leonardo da Vinci

LUZ, Isabelle da Silva. **Caracterização molecular das toxinas em *Staphylococcus aureus* isolados de leite e queijo de coalho em municípios da região Agreste de Pernambuco.** 2008. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2008.

RESUMO

O leite e o queijo têm um importante papel nutricional para o homem e quando consumidos sem o devido cuidado higiênico-sanitário, podem causar doenças devido à presença de microrganismos patogênicos, com destaque para *Staphylococcus aureus*. O envolvimento desta bactéria na epidemiologia das doenças veiculadas por alimentos decorre de sua alta prevalência e do risco de produção de enterotoxinas termoestáveis responsáveis pela intoxicação alimentar. *S. aureus* também produz outras toxinas de interesse humano como a toxina-1 da síndrome do choque tóxico, responsável pela síndrome do choque tóxico em humanos e as toxinas esfoliativas, causadoras da síndrome da pele escaldada. Alguns grupos vêm aplicando análises moleculares do gene da coagulase para subdividir os *S. aureus* baseando-se no polimorfismo deste gene. A resistência bacteriana a antibióticos é um sério problema para a Saúde Pública, pois bactérias resistentes podem ser transmitidas ao homem através de alimentos contaminados. Este trabalho teve como objetivos isolar *S. aureus* obtidos de leite e queijo de coalho da região Agreste de Pernambuco; caracterizar o perfil de sensibilidade antimicrobiana; pesquisar a presença dos genes responsáveis pelas toxinas; investigar a expressão dos genes toxigênicos nos *S. aureus* e correlacionar a tipagem molecular pelo gene da coagulase com os genes toxigênicos. Os perfis de sensibilidade demonstraram que a maioria dos *S. aureus* foi sensível a vancomicina, sulfam + trimetoprim e enrofloxacin e alguns isolados demonstraram alto índice de resistência aos demais antibióticos estudados. A análise do gene *coa* nos 94 isolados de *S. aureus* permitiu distribuí-los em dois coagulotipos: *coa1*= ~750pb e *coa2*= ~1000pb sugerindo a disseminação de clones restritos na região Agreste de Pernambuco. Entre os 88 *S. aureus* positivos pela PCR, foram encontrados os genótipos *seg*, *seh*, *sei*, *seg + seh*, *seg + sei*, *seg + sej*, *seh + sei*, *seg + seh + sei*, *seg + sei + sej* e *seg + seh + sei + sej*. Estes resultados sugerem a existência de uma variação geográfica na distribuição dos *S. aureus* portadores dos genes toxigênicos. Destes, 20 isolados foram selecionados para análise pela RT-PCR. Os transcritos obtidos em 12/20 foram *seg*, *seh*, *sei*, *seg + seh*, *seg + sej* e *seg + sei + sej*, *coa1* e *coa2*. Os isolados de *S. aureus* positivos pela PCR e RT-PCR examinados neste estudo expressaram os genes responsáveis pelas enterotoxinas apresentando potencial para causarem quadros de intoxicação alimentar.

Palavras-chave: Intoxicação Alimentar Estafilocócica, Coagulase, *Staphylococcus aureus*, Resistência Bacteriana a Drogas

LUZ, Isabelle da Silva. **Caracterização molecular das toxinas em *Staphylococcus aureus* isolados de leite e queijo de coalho em municípios da região Agreste de Pernambuco.** 2008. Dissertation (Master of Public Health) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2008.

ABSTRACT

Milk and cheese have an important role in human nutrition and when consumed without proper hygienic/sanitary precautions, they can cause disease due to the presence of pathogenic microorganisms, particularly *Staphylococcus aureus*. The involvement of this bacterium in the epidemiology of food-borne diseases is due to its high prevalence and risk of producing thermostable enterotoxins that are responsible for food poisoning. *S. aureus* can produce other toxins of interest to human health such as toxic shock syndrome toxin-1, responsible for toxic shock syndrome in humans and the exfoliative toxins, causative agents of scalded skin syndrome. Some have applied molecular analyses of the coagulase gene to subdivide *S. aureus* based on the polymorphism of this gene. Bacterial resistance to antibiotics is a serious problem for the Public Health Department because resistant bacteria can be transmitted humans through contaminated foods. The aims of this study were to isolate *S. aureus* obtained from milk and “coalho” cheese from the Agreste region of Pernambuco, characterize the antimicrobial sensitivity profile, research the presence of genes responsible for toxins, investigate the expression of the toxigenic genes in isolates of *S. aureus* and correlate molecular typing by the coagulase gene with the presence of toxigenic genes. The antimicrobial sensitivity profile demonstrated that the majority of the *S. aureus* isolates was sensitive to vancomycin, sulfa + trimethoprim and enrofloxacin, and some demonstrated a high level of resistance others antibiotics tested. The analysis of the gene *coa* in 94 *S. aureus* isolates allowed their distribution into two coagulotypes, *coa1*= ~750 bp and *coa2*= ~1000 bp, suggesting the spread of clones restricted to the Agreste region of Pernambuco. Among the 88 *S. aureus* isolates positive by PCR, the following genotypes were found: *seg*, *seh*, *sei*, *seg* + *seh*, *seg* + *sei*, *seg* + *sej*, *seh* + *sei*, *seg* + *seh* + *sei*, *seg* + *sei* + *sej* and *seg* + *seh* + *sei* + *sej*. These results suggest the existence of a geographic variation in distribution of *S. aureus* carrying toxigenic genes. Of these, 20 isolates were selected for analysis by RT-PCR. The transcripts obtained in 12/20 were *seg*, *seh*, *sei*, *seg* + *seh*, *seg* + *sej* and *seg* + *sei* + *sej*, and *coa1* and *coa2*. The *S. aureus* isolates positive by PCR and RT-PCR examined in this study expressed genes responsible for enterotoxins and showed potential to cause a clinical picture of food poisoning.

Keywords: Staphylococcal Food Poisoning, Coagulase, *Staphylococcus aureus*, Bacterial Resistance to Drugs

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Morfologia (A) e característica morfotintorial pela técnica de coloração de Gram (B) de microrganismos pertencentes ao gênero <i>Staphylococcus</i> spp	17
Figura 2 -	Sinais da síndrome do choque tóxico estafilocócico	31
Figura 3 -	Sinais da síndrome estafilocócica da pele escaldada	33
Figura 4 -	Esquema da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	38
Figura 5 -	Esquema da Reação em Cadeia da Polimerase Transcriptase Reversa (RT-PCR)	39
Figura 6 -	Esquema da região da seqüência repetitiva do gene da coagulase (<i>coa</i>)	41
Figura 7 -	Esquema representativo dos sítios de restrição da enzima <i>AluI</i> dentro do gene <i>coa</i> e localização do anelamento dos <i>primers</i> COAG2 e COAG3	41
Figura 8 -	Mesorregião Agreste dividida em municípios, destacando os municípios onde foram realizadas as coletas de leite e queijo de coalho	47
Figura 9 -	Métodos fenotípicos utilizados na caracterização de <i>S. aureus</i>	48
Figura 10 -	Produtos de amplificação representativos da PCR-Uniplex dos genes <i>seg</i> , <i>seh</i> , <i>sei</i> e <i>sej</i>	57
Figura 11 -	Produtos de amplificação dos genes <i>sea</i> , <i>seb</i> , <i>sec</i> , <i>sed</i> e <i>tst</i> nas cepas padrão de <i>S. aureus</i> FRI através da PCR-Multiplex	58
Figura 12 -	Perfis eletroforéticos representativos da PCR do gene <i>coa</i> de <i>S. aureus</i> isolados em municípios da região Agreste de Pernambuco	59
Figura 13 -	Padronização da RT-PCR com concentrações variáveis do RNA total	61
Figura 14 -	Amplificação por PCR dos transcritos <i>coa</i> nos 20 isolados de <i>S. aureus</i> investigados pela RT-PCR	62
Figura 15 -	Amplificação por PCR dos transcritos <i>seg</i> , <i>seh</i> , <i>sei</i> e <i>sej</i> nos 12 isolados de <i>S. aureus</i> investigados pela RT-PCR	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Seqüências dos <i>primers</i> utilizados para a detecção dos genes responsáveis pela produção das toxinas (SEA-SEE, SEG-SEJ, ETA-ETB e TSST-1), tamanho esperado dos fragmentos e referências	51
Tabela 2 -	Percentual de resistência aos antibióticos de 94 <i>S. aureus</i> isolados de leite e queijo de coalho de cinco municípios da região Agreste de Pernambuco	55
Tabela 3 -	Distribuição dos genes <i>seg</i> , <i>seh</i> , <i>sei</i> e <i>sej</i> encontrados nos 94 <i>S. aureus</i> isolados de leite e queijo de coalho de cinco municípios da região Agreste do estado de Pernambuco	57
Tabela 4 -	Perfis genotípicos dos isolados de <i>S. aureus</i>	60
Tabela 5 -	Isolados de <i>S. aureus</i> selecionados por município e por genótipo para realização da RT-PCR	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>AluI</i>	Enzima de restrição, extraída de <i>Haemophilus aegyptius</i>
ATCC	American Type Culture Collection
BHI	Brain Heart Infusion
BI	Bullous Impetigo
CDC	Center for Disease Control and Prevention
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
<i>coa</i>	Gene da coagulase
DEPC	Dietil Pirocarbonato
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNAc	DNA complementar
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfato
dTT	1,4-Dithiothreitol
<i>egc</i>	Enterotoxin gene cluster
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
<i>eta-etd</i>	Gene para toxinas esfoliativas ETA-ETD
ET	Exfoliative Toxin
ETA-ETD	Exfoliative Toxins A-D
FRI	Food Research Institute
GC	Guanina + Citosina
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina
ORF	Open Reading Frame
pb	Pares de bases
PCR	Polymerase Chain Reaction
PT	Pyrogenic Toxin
RNA _m	RNA mensageiro
RT-PCR	Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction
<i>se</i>	Gene para enterotoxinas estafilocócicas
<i>sea-see</i>	Gene para enterotoxinas estafilocócicas A-E
<i>seg-ser</i>	Gene para enterotoxinas estafilocócicas G-R
<i>seu-sev</i>	Gene para enterotoxinas estafilocócicas U-V
SEs	Staphylococcal Enterotoxins

SEA-SEF	Staphylococcal Enterotoxins A-F
SEG-SER	Staphylococcal Enterotoxins G-R
SEU-SEV	Staphylococcal Enterotoxins U-V
SpA	Staphylococcus protein A
SPE	Streptococcal Pyrogenic Exotoxin
SSRs	Short Sequence Repeats
SSSS	Staphylococcal Scalded Skin Syndrome
TCR	T Cell Receptor
TE	Tris-EDTA
Tris-HCl	Aminometano-ácido clorídrico
TSS	Toxic Shock Syndrome
TSST-1	Toxic Shock Syndrome Toxin-1
<i>tst</i>	Gene para a toxina-1 da síndrome do choque tóxico estafilocócico
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
UV	Ultra Violeta
VISA	<i>Staphylococcus aureus</i> com resistência intermediária à vancomicina
VRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> vancomicina resistente

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	17
2.2 Leite	19
2.3 Queijo de Coalho	20
2.4 Fatores de Patogenicidade do <i>Staphylococcus aureus</i>	22
2.5 Intoxicação Alimentar Estafilocócica	24
2.6 Enterotoxinas Estafilocócicas (SEs)	26
2.6.1 Aspectos Genéticos	28
2.7 Toxina-1 da Síndrome do Choque Tóxico (TSST-1)	30
2.8 Toxinas Esfoliativas (ETs)	32
2.9 Uso de Antimicrobianos	34
2.10 Epidemiologia Molecular na Investigação das Toxinas Estafilocócicas	35
2.11 Polimorfismo do Gene da Coagulase (<i>coa</i>)	39
3 JUSTIFICATIVA	42
4 PERGUNTA CONDUTORA	44
5 HIPÓTESES	45
6 OBJETIVOS	46
6.1 Objetivo Geral	46
6.2 Objetivos Específicos	46

7 MATERIAL E MÉTODOS	47
7.1 Isolamento Microbiológico e Identificação Fenotípica dos <i>Staphylococcus aureus</i> ..	47
7.2 Teste de Sensibilidade Antimicrobiana <i>in vitro</i>	48
7.3 Extração do DNA Genômico para Ensaio Baseado em PCR	48
7.4 Detecção dos Genes Toxigênicos através da Técnica da PCR	49
7.4.1 PCR - Multiplex	49
7.4.2 PCR -Uniplex	50
7.5 Purificação e Seqüenciamento dos Fragmentos Amplificados pela PCR	52
7.6 Pesquisa do Gene <i>coa</i> nos Isolados de <i>S. aureus</i> através da PCR	52
7.7 Extração do RNA Total	53
7.8 Análise da Expressão das Toxinas em <i>S. aureus</i>	53
8 RESULTADOS	55
9 DISCUSSÃO	64
10 CONCLUSÕES	70
REFERÊNCIAS	71
APÊNDICE - ARTIGO CIENTÍFICO	96
ANEXO A - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa do CPqAM/ FIOCRUZ	124
ANEXO B - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa do CPqAM/ FIOCRUZ	125

1 INTRODUÇÃO

O leite é um dos alimentos mais completos da natureza, de elevado valor nutritivo, principalmente como fonte de proteína, sais minerais, gordura e vitaminas (LEITE *et al.*, 2002). A produção leiteira em Pernambuco constitui-se numa das principais atividades econômicas, concentrando-se principalmente na Região do Agreste Pernambucano, que é responsável por grande parte da produção estadual, abastecendo as cidades locais e a Região Metropolitana do Recife (IBGE, 2004).

Entre os derivados do leite, no caso da Região Nordeste, destaca-se o queijo de coalho, que é produzido com massa semicozida e tradicionalmente consumido fresco ou maturado, sendo comum o emprego de leite cru para seu preparo. Surto relacionado ao consumo de leite e queijo contaminados com bactérias causadoras de doenças transmitidas por alimentos foram freqüentemente relatados (IKEDA *et al.*, 2005; KÉROUANTON *et al.*, 2007; PEREIRA *et al.*, 1996).

O *Staphylococcus aureus* é um dos agentes patogênicos mais comuns, responsáveis por surtos de intoxicação alimentar. As peculiaridades do seu habitat tornam sua presença amplamente distribuída na natureza, sendo transmissíveis aos alimentos por manipuladores, na maioria, portadores assintomáticos, e pelos animais, principalmente o gado leiteiro com mastite (BALABAN; RASOOLY, 2000).

A intoxicação alimentar estafilocócica é atribuída à ingestão de enterotoxinas produzidas e liberadas pela bactéria durante sua multiplicação no alimento. É caracterizada por sintomas gastrointestinais como náusea, vômito, dores abdominais e diarreia em humanos (SCHERRER *et al.*, 2004). A enterotoxina é termoestável, podendo permanecer no alimento mesmo após o cozimento, favorecendo a ocorrência da intoxicação (ALCARÃS *et al.*, 1997).

S. aureus também produz outras toxinas extracelulares como a toxina-1 da síndrome do choque tóxico, responsável pela síndrome do choque tóxico em humanos (CARDOSO *et al.*, 1999) e as toxinas esfoliativas, causadoras da síndrome da pele escaldada (ENDO *et al.*, 2003).

A análise do gene da coagulase (*coa*) através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR¹) é aplicada para subdividir amostras de *S. aureus* baseada no polimorfismo do gene *coa*, utilizando iniciadores específicos direcionados a fragmentos com diferentes pesos moleculares (VIEIRA-DA-MOTTA; FOLLY; SAKYIAMA, 2001). O desenvolvimento de

¹ PCR: Polymerase Chain Reaction. Será utilizada a sigla ao longo do trabalho.

métodos rápidos, sensíveis e eficazes para a detecção de patógenos de origem alimentar tem recebido maior atenção nos recentes anos devido ao acréscimo da consciência pública dos riscos de saúde associados com a contaminação microbiológica de alimentos (RAMESH *et al.*, 2002).

A PCR é aplicada como um método para a detecção dos genes responsáveis pelas toxinas estafilocócicas. Uma variação da PCR, a PCR-Multiplex, permite numa mesma reação, detectar vários genes responsáveis pelas toxinas, contribuindo para o estudo epidemiológico destas bactérias e seu envolvimento em doenças de origem alimentar (BECKER; ROTH; PETERS, 1998; SALASIA *et al.*, 2004).

O isolamento do RNAm como um método para estudar regulação transcricional é usado para tentar estabelecer se os genes são de fato funcionais no ambiente nativo. A expressão das toxinas-alvo, através da detecção da seqüência do RNAm responsável pela produção das mesmas, pode determinar o potencial tóxico dos microrganismos (DINJUS *et al.*, 1997).

Outro aspecto importante é a presença de resíduos de antibióticos que pode interferir diretamente na qualidade do leite e nos processos industriais, inibindo culturas sensíveis. Atualmente, tem-se enfatizado a possibilidade de resíduos de antimicrobianos em alimentos provocarem aumento de resistência nas bactérias presentes na flora intestinal do homem (PORTUGAL; BRITO; CASTRO, 2001).

Devido à importância das toxinas na patogenicidade do *S. aureus* veiculado por alimentos como o leite e o queijo de coalho, serão abordados aspectos concernentes às características destas bactérias isoladas de municípios da região Agreste de Pernambuco, seus principais fatores de patogenicidade, com ênfase nas principais toxinas, além do destaque para a resistência aos antimicrobianos e genotipagem do gene da coagulase.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 *Staphylococcus aureus*

De acordo com o *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* - 1986, a família Micrococcaceae é composta por quatro gêneros: *Planococcus*, *Micrococcus*, *Stomatococcus* e *Staphylococcus*, sendo o gênero *Staphylococcus* atualmente dividido em cerca de 42 espécies registradas no banco de dados *Taxonomy Browser* (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, 2006).

A primeira descrição de bactérias do gênero *Staphylococcus* (do grego “*staphyle*” = cacho de uvas, e “*cocos*” = grão) foi realizada por Ogston em 1880, que relatou *coccus* em formato de cacho de uva, como a causa de um grande número de doenças piogênicas (BAIRD-PARKER, 1990).

As bactérias do gênero *Staphylococcus* são cocos Gram-positivos encontrados como organismos comensais ou patógenos bacterianos tanto em humanos como em animais. São imóveis, com diâmetro variando entre 0,5 a 1,5 μ m, não formadoras de esporos podendo aparecer de forma isolada, em pares, cadeias curtas ou em cachos (Figura 1A-B). São formadoras de colônias pigmentadas, em geral não-capsuladas, catalase e termonuclease positivas e coagulase positivas ou negativas (RAVEL, 1997; ZECCONI; HAHN, 2000). Em meio de Agar Sangue, alguns isolados produzem β -hemólise (KONEMAN *et al.*, 2001).

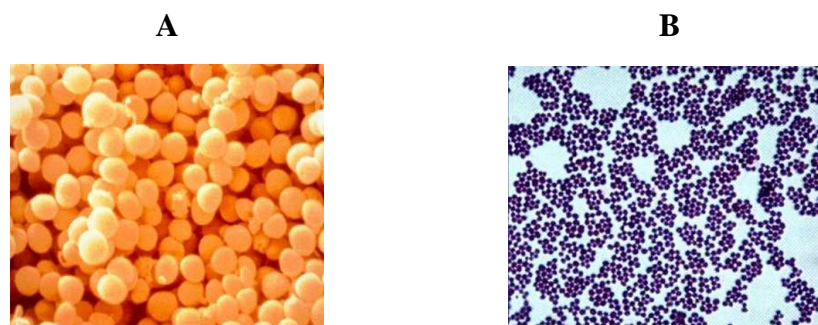


Figura 1- Morfologia (A) e característica morfológica pela técnica de coloração de Gram (B) de microrganismos pertencentes ao gênero *Staphylococcus* spp.

Fonte: Science Photo Library (2007) e Tortora, Funke e Case (2005).

Somente as espécies *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus delphini*, *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus schleiferi coagulans* e alguns isolados de *Staphylococcus hyicus* são coagulase positivos. A maioria das espécies de *Staphylococcus* é coagulase negativa (HOLT *et al.*, 1994).

Diferem das espécies do gênero *Micrococcus* spp. por serem oxidase-negativa, fermentarem glicose em anaerobiose, possuírem ácido teicóico como constituinte de sua parede celular e DNA com conteúdo bastante reduzido de GC (30 a 39%) (MADIGAN; MARTINKO; PERKER, 1997; RAVEL, 1997). A parede celular dos estafilococos é resistente a lisozima e sensível a lisostafina, que cliva especificamente as pontes cruzadas de peptidoglicano com pentaglicina (ZYGMUNT; BROWDER; TAVORMINA, 1967).

Estes microrganismos são resistentes a condições severas e podem ser recuperados de ambientes não-fisiológicos meses após a inoculação (LISA; PLANO, 2004). Um dos principais patógenos oportunistas deste gênero, *S. aureus*, coloniza uma porção extensa da população humana (GILL *et al.*, 2005). O nome desta espécie deriva da coloração de suas colônias logo assim que passaram a ser estudadas e isoladas por Rosembach (1884 apud SILVEIRA FILHO, 2007), que nomeou inicialmente *S. pyogenes aureus*, para as colônias amareladas e *S. pyogenes albus*, para as brancas. Entretanto, já é sabido que a pigmentação da colônia é bastante variável, considerando-se apenas o nome *Staphylococcus aureus* Rosembach (JUDICIAL COMMISSION, 1958).

O habitat primário de *S. aureus* em humanos é a mucosa da nasofaringe onde a bactéria existe como um membro persistente ou transitório da microbiota normal sem causar quaisquer sintomas (FUEYO *et al.*, 2005) podendo, entretanto ser encontrado regularmente em outros sítios anatômicos (BHATIA; ZAHOR, 2007) tais como a pele (NOBLE, 1998) e transitoriamente a orofaringe (SMITH; JACKSON; BAGG, 2001) e fezes (ARVOLA *et al.*, 2006). Portadores assintomáticos são a principal fonte de infecção por *S. aureus*, podendo causar doenças adquiridas tanto no ambiente hospitalar como na comunidade (FUEYO *et al.*, 2005).

S. aureus apresenta temperatura de crescimento na faixa de 7°C a 48,5°C (com temperatura ótima de 35 a 37°C) e são tolerantes a concentrações de 10% a 20% de cloreto de sódio e nitratos (FRAZIER; WESTHOFF, 2000).

É capaz de crescer dentro de uma escala compreendida entre os valores de pH 4,0 e 9,8, sendo o pH ótimo para crescimento, compreendido entre 6,0 e 7,0 (FRANCO; LANDGRAFF, 2000). Estas características possibilitam *S. aureus* crescer numa grande

variedade de alimentos que requerem manipulação durante o processamento, incluindo produtos alimentares fermentados, tais como queijos (LE LOIR; BARON; GAUTIER, 2003).

2.2 Leite

O leite apresenta um valor alimentar inestimável na nutrição humana (FERREIRO; SOUZA; HEINECK, 1980) por conter proteínas de alto valor biológico, por sua riqueza em cálcio e fósforo e por conter notáveis quantidades de vitaminas A e B₂, além de exercer uma influência reguladora sobre a flora bacteriana do trato intestinal (VEISSEYRE, 1998).

Devido a sua constituição, o leite torna-se um excelente meio de cultura para o desenvolvimento de microrganismos podendo ser responsável pela transmissão de importantes zoonoses ao homem (AMARAL *et al.*, 2004). Estes microrganismos podem contaminar o leite durante ou após a ordenha e conseqüentemente os derivados de leite, os quais podem ainda sofrer contaminação durante processamento e estocagem, principalmente nos casos em que há grande manipulação do produto (NOUT, 1994).

No Brasil, de modo geral, o leite é obtido em más condições higiênico-sanitárias, apresentando contagens altas de microrganismos, constituindo-se em risco à Saúde Pública, principalmente, quando consumido cru, sem tratamento térmico (CERQUEIRA, 1997). No caso da região Nordeste, observa-se uma elevada taxa de crescimento no número de agroindústrias que utilizam como matéria-prima o leite produzido pelos pequenos e médios produtores. Contudo, a qualidade dos laticínios produzidos configura-se muitas vezes como um dos principais entraves na sua comercialização (NASSU *et al.*, 2003).

Nos Estados Unidos, Eveson *et al.* (1988) investigaram um surto de intoxicação causado por leite achocolatado não sendo isolado *S. aureus*, mas foram detectadas enterotoxinas no produto. Os autores atribuíram a presença das toxinas no leite já pasteurizado a falhas na produção e resfriamento do leite cru, antes do processamento térmico.

Alguns estudos realizados no Brasil têm demonstrado alta contaminação de leite e derivados por *S. aureus* (CARMO *et al.*, 1994; CERQUEIRA *et al.*, 1994; SANTOS; NOGUEIRA; CUNHA, 1995; SENA *et al.*, 1998; SENA, 2000). Araújo (1984) ao analisar 100 amostras de leite cru no município de Niterói, verificou que 50% apresentaram-se positivas para *S. aureus*, sendo que 48% das amostras positivas apresentaram contagens

variando de 10^3 a valores superiores a 10^5 UFC/mL. Santos, Genigeorges e Farver (1981) ao analisarem 78 amostras de leite cru em Minas Gerais, observaram que 47% estavam contaminados por este agente em contagens variando de $3,0 \times 10^3$ a $9,8 \times 10^5$ UFC/mL. Os dados obtidos nos referidos trabalhos indicam um risco potencial à saúde humana associado ao consumo do leite contaminado por *S. aureus*.

A garantia da qualidade do leite, principalmente para evitar veiculação de agentes infecciosos ao homem, se inicia com o atestado sanitário da vaca, do ordenhador, das condições sanitárias do ambiente em que as vacas são ordenhadas, do equipamento usado na coleta e transporte do leite. Depende ainda, das condições higiênico-sanitárias durante a produção, do tratamento térmico, da temperatura de armazenamento do leite na propriedade, durante o transporte até a indústria, assim como os cuidados na rede de distribuição e no consumo (SANTOS; GENIGEORGES; FARVER, 1981).

2.3 Queijo de Coalho

Dentre os produtos derivados do leite, o queijo é considerado um veículo freqüente de patógenos de origem alimentar e, em especial, os queijos frescos artesanais por serem, na maioria das vezes, elaborados a partir de leite cru e não sofrerem processo de maturação. A contaminação microbiana desses produtos assume destacada relevância tanto para a indústria, pelas perdas econômicas, como para a Saúde Pública, pelo risco de causar doenças transmitidas por alimentos (FEITOSA *et al.*, 2003).

A obtenção higiênica do leite é o primeiro ponto crítico no processo de fabricação de queijos e de outros derivados, uma vez que os microrganismos podem ser introduzidos no produto (LANGE; BRITO, 2003; SCHOLZ, 1997). Desta forma, a qualidade do produto final é influenciada pelas condições higiênico-sanitárias em que o leite foi obtido, pelo processamento na indústria, pelas condições de sanitização do ambiente, qualidade da água e pelo armazenamento e transporte da matéria-prima e do produto (INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS, 1997).

A pasteurização do leite tanto para consumo *in natura* como para a produção de creme e queijos reduz os riscos de toxinfecções alimentares, entretanto, falhas durante o processamento e comercialização do queijo podem favorecer a incorporação de matérias estranhas de origem biológica ou não. A contaminação microbiana de queijos de coalho

assume destacada relevância em Saúde Pública ao se considerar que bactérias enterotoxigênicas e patogênicas como *S. aureus* e *Salmonella* são comumente encontradas em derivados lácteos (PERESI *et al.*, 2001).

Vários estudos sobre a qualidade microbiológica de queijo de coalho relataram a ocorrência de microrganismos patogênicos e contagens de microrganismos deteriorantes em números que excedem, às vezes, os limites estabelecidos pela legislação (BASTOS *et al.*, 2001; FEITOSA *et al.*, 2003; NASSU *et al.*, 2000). Dentre as bactérias patogênicas detectadas destacavam-se *S. aureus*, *Salmonella* e *Listeria monocytogenes* (BORGES *et al.*, 2003).

A produção de queijo de coalho no Brasil é restrita à região Nordeste, principalmente aos estados da Paraíba, Ceará, Rio Grande do Norte e Pernambuco, onde o produto é tradicional e portanto bastante consumido (LEITE JÚNIOR *et al.*, 2000). A produção rural de queijo de coalho tem participação considerável na economia, colocando-se como extremamente expressiva na formação de renda dos produtores de leite, principalmente daqueles que não têm acesso às usinas de beneficiamento (NASSU *et al.*, 2003). Por ser elaborado, em quantidade considerável, a partir de leite cru e sem os devidos cuidados de higiene, em pequenas propriedades rurais ou em pequenas indústrias que não adotam as Boas Práticas de Fabricação, o queijo de coalho não apresenta segurança microbiológica e padronização da qualidade (FEITOSA *et al.*, 2003).

A contaminação do queijo de coalho, produzido em vários estados do Nordeste por *S. aureus*, variou entre 10^3 e 10^6 UFC/g (NASSU *et al.*, 2000; PAIVA; CARDONHA, 1999). Estes valores são preocupantes, pois se situam acima dos limites estabelecidos pelos Ministérios da Agricultura, Pecuária e Abastecimento e da Saúde, cujo máximo permitido é 10^3 UFC/g (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2001; BRASIL. M.AP.A., 1996). Concentrações superiores a 10^5 UFC/g podem propiciar a produção de enterotoxinas (FORSYTHE, 2000) e oferecer risco potencial à saúde do consumidor.

O queijo de coalho produzido em Pernambuco artesanalmente tem como processamento a recepção do leite integral cru, filtração, adição do coalho, coagulação, quebra da coalhada, dessoragem parcial, enformagem, prensagem manual, prensagem mecânica, salga seca, desenformagem, lavagem do produto e consumo (MORAIS, 1995).

2.4 Fatores de Patogenicidade do *Staphylococcus aureus*

S. aureus é responsável por um espectro muito difundido de infecções em humanos e em diferentes espécies animais (ZSCHÖCK *et al.*, 2005). Constitui o mais comum agente etiológico da mastite bovina contagiosa, com perdas economicamente relevantes para a indústria leiteira causando redução na qualidade do leite e direcionando a perda em produção e uso elevado de drogas e serviços veterinários (BECK; WISE; DODD, 1992; BLAIOTTA *et al.*, 2006; ZECCONI *et al.*, 2006). Produz e secreta 30 ou mais fatores de patogenicidade específicos que interferem com as defesas do hospedeiro (DINGES; ORWIN; SCHLIEVERT, 2000).

As patologias causadas por *S. aureus* podem ser divididas em infecções e doenças causadas por toxinas (NOVAK, 1999). As infecções podem ser localizadas como pústulas, furúnculos, impetigos, processos mais extensos e graves como infecção pós-cirúrgica, osteomielite, pneumonia, endocardite, meningite etc., ou disseminadas como bacteremia e septicemia. As doenças causadas por toxinas também apresentam importantes manifestações clínicas, como celulite, intoxicação alimentar, síndrome do choque tóxico e síndrome da pele escaldada (ARBUTHNOTT; COLEMAN; AZEVEDO, 1990; CORBELLA *et al.*, 1997).

A patogenicidade de *S. aureus* é multifatorial, geralmente envolvendo um grande número de proteínas extracelulares e outros fatores de virulência. Algumas destas proteínas, incluindo citotoxinas e exoenzimas, são secretadas; outras, incluindo a proteína A e várias adesinas, fixam-se na parede celular. Juntas, estas proteínas capacitam o microrganismo a escapar das defesas do hospedeiro, aderir às células e moléculas da matriz intercelular, invadir ou destruir as células do hospedeiro, e a se propagar dentro dos tecidos. Sua produção é governada por uma cadeia complexa de funções regulatórias cuja expressão *in vitro* é temporariamente programada e depende amplamente, direta ou indiretamente, de sinais ambientais (VOJTOV; ROSS; NOVICK, 2002).

Apesar do mecanismo de patogenicidade do *S. aureus* ainda não estar completamente esclarecido, sabe-se que suas exotoxinas superantigênicas, como enterotoxinas (SEs) e toxina-1 da síndrome do choque tóxico (TSST-1), parecem ter papel inicial. São consideradas superantígenos, por estimularem uma resposta policlonal inespecífica de linfócitos T e a liberação aumentada de citocinas, causando toxicidade sistêmica e supressão da resposta imune adaptativa (BALABAN; RASOOLY, 2000; MARRACK; KAPPLER, 1990).

Biofilmes são agregados de microrganismos embebidos em uma matriz polimérica e aderidos a uma superfície sólida, formando uma estrutura porosa e altamente hidratada contendo exopolissacarídeos e pequenos canais, abertos por entre as microcolônias (LAWRENCE *et al.*, 1991). Este tipo de organização é extremamente vantajoso, por fornecer proteção contra adversidades como desidratação, colonização por bacteriófagos e resistência a antimicrobianos (GILBERT; MCBAIN; RICHARD, 2003).

Na linha de produção da indústria de laticínios, a formação de biofilmes eleva a carga microbiana e, muitas vezes, contamina com patógenos os alimentos que ali circulam, devido ao eventual desprendimento de porções aderidas. Desta forma, pode colocar em risco a saúde do consumidor, além de ocasionar prejuízos financeiros à indústria, em virtude da diminuição da vida de prateleira dos produtos alimentícios (MARSHALL, 1992; ZOTTOLA, 1994).

Alguns tipos de alfa e beta hemolisinas induzem mudanças pró-inflamatórias nas células, inativam o sistema imune por efeito citotóxico direto, e degradam tecidos (PROJAN; NOVICK, 1997). A alfa-hemolisina produzida por estafilococos é muito ativa contra eritrócitos de algumas espécies animais. Esta toxina apresenta ação necrosante em pequenos vasos e aparentemente induz a formação de poros, alterando a permeabilidade da membrana celular. As hemolisinas estafilocócicas beta, gama e delta apresentam menor toxicidade, mas seus mecanismos de atuação ainda não foram esclarecidos (BUTT *et al.*, 1998; DINGES; ORWIN; SCHLIEVERT, 2000). Por outro lado, a leucocidina apresenta ação destrutiva direcionada a neutrófilos e macrófagos, permitindo que *S. aureus* escapem ilesos da fagocitose (DINGES; ORWIN; SCHLIEVERT, 2000; MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 1997).

A enzima hialuronidase provoca lise do ácido hialurônico, que compreende boa parte da matriz extracelular do tecido conjuntivo e facilita a disseminação dos microrganismos através dos tecidos. A enzima catalase, também produzida por *S. aureus*, promove a conversão do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio. O peróxido de hidrogênio é gerado pelo organismo como mecanismo de lise bacteriana (ROSSI; CECCON; KREBS, 2005).

A colonização da pele por essa bactéria ocorre provavelmente por sua capacidade de resistir a altas concentrações de lipídios, bem como por produzirem proteínas de superfície que se ligam a fibronectina, presentes na superfície das células do hospedeiro. Estas proteínas são denominadas de proteínas de ligação a fibronectina A e B, sendo consideradas

importantes fatores de virulência, uma vez que promovem a ligação da bactéria às células do hospedeiro (FLOCK *et al.*, 1990).

Uma proteína de superfície espécie-específica ancorada à parede celular do *S. aureus*, proteína A estafilocócica (SpA, do inglês *Staphylococcus protein A*), tem a habilidade de interagir com muitos componentes do hospedeiro, possivelmente desenvolvendo um papel como fator de virulência em infecções (PALMQVIST *et al.*, 2002). Esta proteína encontra-se ancorada covalentemente à parede celular da maioria dos *S. aureus* (SCHLEIFER; KROPPESTEDT, 1990).

Outra substância produzida por *S. aureus* é a coagulase, um fator enzimático que causa coagulação da fibrina, resultando numa espécie de coágulo (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 1997). A produção da coagulase é um importante determinante fenotípico na caracterização de isolados de *S. aureus* (KIM *et al.*, 2001; MCDONALD; CHAPIN, 1995). Geralmente está associada a patogenicidade, apesar do seu papel como fator de virulência ainda não estar esclarecido (SILVA *et al.*, 2005; PRATTEN *et al.*, 2001; SU *et al.*, 1999). Sabe-se que o coágulo produzido por esta enzima resulta no acúmulo de fibrina ao redor das células bacterianas, isolando a área infectada e dificultando a ação dos mecanismos de defesas do hospedeiro (MADIGAN *et al.*, 1997).

2.5 Intoxicação Alimentar Estafilocócica

Franco e Landgraff (1996) definem as intoxicações alimentares como doenças de origem alimentar causadas pela ingestão de alimentos contendo toxinas microbianas pré-elaboradas nestes alimentos. Estas toxinas são produzidas durante a intensa proliferação dos microrganismos patogênicos presentes nos alimentos. Neste grupo, enquadram-se *S. aureus*, *Clostridium botulinum*, *Bacillus cereus*. Segundo Baird-Parker (1990), desde 1930 têm-se demonstrado que *S. aureus* são comuns e largamente difundidos nas intoxicações alimentares.

As exotoxinas são proteínas ou enzimas produzidas no interior de algumas bactérias Gram-positivas, decorrentes da multiplicação e metabolismo dos microrganismos, e liberadas na corrente sanguínea. Classicamente são agrupadas em três tipos, de acordo com seu modo de ação: citotoxinas, que destroem as células do hospedeiro ou afetam suas funções; neurotoxinas, que interferem com a transmissão normal de impulsos nervosos; e enterotoxinas, que afetam as células que revestem o trato gastrointestinal. As endotoxinas

correspondem à porção externa da parede celular (lipopolissacarídeos) das bactérias Gram-negativas, que são liberadas após a morte bacteriana ou mesmo após a lise da parede celular (TORTORA; FUNKE; CASE, 2002).

As principais exotoxinas produzidas pelos estafilococos são as enterotoxinas, responsáveis pela intoxicação alimentar estafilocócica no homem. São produzidas por *S. aureus*, no entanto, outras espécies coagulase positiva, *S. intermedius* e *S. hyicus* foram apontadas como enterotoxigênicas (SENA, 2000), bem como espécies coagulase negativas (RAPINI *et al.*, 2003).

S. aureus enterotoxigênico é um dos principais patógenos responsáveis por casos de intoxicação alimentar no mundo inteiro (DINGES; ORWIN; SCHLIEVERT, 2000), sendo estimado pelo Center for Disease Control and Prevention (CDC) como causa de 185.000 casos de intoxicação alimentar nos Estados Unidos anualmente (MEAD *et al.*, 1999). Aproximadamente 1,5 bilhão de dólares é gasto anualmente nos Estados Unidos por causa das intoxicações estafilocócicas (SU; WONG, 1997).

Em muitos países as SEs constituem o segundo ou terceiro mais comum agente causal de intoxicação alimentar (ATANASSOVA; MEINDL; RING, 2001). Casos de intoxicação alimentar e prevalência de *S. aureus* em diferentes tipos de alimentos como frutos do mar, leite e derivados, carne e derivados foram relatados principalmente nos países da América, Europa e Ásia Oriental (JORGENSEN *et al.*, 2005a; MARTIN *et al.*, 2004; SMYTH *et al.*, 2005).

As enterotoxinas produzidas e liberadas pelos estafilococos durante sua multiplicação nos alimentos são termoestáveis, o que indica que a temperatura de cozimento dos alimentos não interfere na atividade biológica das SEs, possibilitando a instalação de quadros de intoxicação alimentar no homem (SILVA JÚNIOR, 1997).

A gastroenterite estafilocócica é causada pela ingestão de alimentos contendo uma ou mais enterotoxinas. Estima-se que 100ng a 1µg são eficientes para produzir a doença em indivíduos susceptíveis (BERGDOLL, 1990). Para que ocorra a produção mínima de enterotoxina estafilocócica no alimento é necessário que haja condições adequadas de temperatura e pH para a multiplicação dos estafilococos, até contagens de 10⁵ UFC/g de alimento, além de condições climáticas e presença de uma flora competitiva (BRASCA *et al.*, 2005; MOSSEL; GARCIA, 1985). A presença ou ausência de oxigênio, sal, açúcar, acidez e a microflora são outros fatores importantes para o crescimento da bactéria no trato gastrointestinal (BHATIA; ZAHOR, 2007).

O diagnóstico de intoxicação alimentar estafilocócica é geralmente confirmado por pelo menos um dos seguintes fatores: a recuperação de mais de 10^5 *S. aureus*/g de alimento, a detecção de SEs no alimento ou o isolamento de *S. aureus* do mesmo fagotipo nos pacientes e no alimento (BRYAN; GUZEWICH; TODD, 1997). O diagnóstico conclusivo é baseado principalmente na demonstração das SEs no alimento (KÉROUANTON *et al.*, 2007).

A intoxicação alimentar estafilocócica pode ser branda, moderada ou severa caracterizando-se por náuseas, vômito, mal-estar e debilidade geral, diarreia aquosa não sanguinolenta e dor abdominal. Pode ocorrer desidratação resultante de significativa perda de líquido, sudorese e cefaléia, mas não se observa febre elevada (MURRAY *et al.*, 1992). Estes sintomas geralmente aparecem uma a seis horas após a ingestão de enterotoxina produzida no alimento por determinados isolados de *S. aureus* e a doença pode permanecer por 7 a 10 dias (ASAO *et al.*, 2003; NEMA *et al.*, 2007).

O início dos sintomas depende, porém, do grau de suscetibilidade e peso do indivíduo, concentração da enterotoxina no alimento e a quantidade do alimento consumido (BAIRD-PARKER, 1990), sendo mais graves em crianças, idosos e pessoas acometidas de doenças crônicas imunossupressoras (CLIVER, 1994).

A intoxicação alimentar estafilocócica é raramente registrada e por essa razão existe informação limitada sobre a prevalência de tipos de SEs, ou seu caráter endêmico e/ou epidêmico (MARTIN *et al.*, 2004). Sua notificação não é considerada compulsória no Brasil e em diversos países desconhecendo-se a verdadeira incidência devido à sintomatologia geralmente branda e de curta duração, uma vez que apenas grandes surtos chegam ao conhecimento das autoridades sanitárias (FRAZIER; WESTHOFF, 2000).

2.6 Enterotoxinas Estafilocócicas (SEs²)

As enterotoxinas estafilocócicas são proteínas extracelulares de baixo peso molecular (26.900 a 29.600 dáltons) pertencentes à família das toxinas pirogênicas (PT) originada de espécies de estafilococos e estreptococos cuja estrutura, função e seqüências de nucleotídeos são semelhantes entre si. Também estão incluídas nesta família a toxina da síndrome do

² SEs: Staphylococcal Enterotoxins

choque tóxico (TSST), as toxinas esfoliativas tipos A e B e as exotoxinas pirogênicas estreptocócicas (SPE).

As enterotoxinas exibem atividade de superantígeno, estimulando a proliferação policlonal de linfócitos T através do complexo formado entre moléculas do complexo principal de histocompatibilidade classe II com a porção variável do receptor de cadeia β ou α do linfócito T (TCR V β e TCR V α , respectivamente) (MARRACK; KAPPLER, 1990; MCCORMICK *et al.*, 2003). Além disso, as enterotoxinas são capazes de estimular a produção de citocinas nas concentrações de 10^{-13} a 10^{-16} molar (JOHNSON; RUSSELL; PONTZER, 1991).

São resistentes à hidrólise pelas enzimas gástricas e jejunais mantendo sua atividade no trato digestivo após ingestão (LE LOIR; BARON; GAUTIER, 2003) e são estáveis ao aquecimento a 100°C durante 30 minutos (MURRAY *et al.*, 1992), não sendo inativadas totalmente pela cocção normal, pasteurização e outros tratamentos térmicos usuais (JAY, 1994). Isto significa que a atividade biológica das enterotoxinas permanece inalterada mesmo após o processamento térmico dos alimentos (HOLECKOVÁ *et al.*, 2002). Além disso, alguns isolados de *S. aureus* produzem quantidades detectáveis de enterotoxinas após 24 horas de incubação a 30°C (PEREIRA *et al.*, 1991).

As SEs são nomeadas de acordo com suas atividades eméticas como o fator etiológico da intoxicação alimentar estafilocócica (HWANG *et al.*, 2007). Com base em suas características antigênicas, diferentes enterotoxinas estafilocócicas foram identificadas. Enquanto SEA, SEB, SEC, SED, SEE (BAYLES; IANDOLO, 1989; BETLEY; MEKALANOS, 1988; COUCH; SOLTIS; BETLEY, 1988; JONES; KHAN, 1986) representam tipos clássicos, quatro SEs adicionais (SEG, SEH, SEI e SEJ) foram descritas, além de seus genes correspondentes (MUNSON *et al.*, 1998; REN *et al.*, 1994; ZHANG; IANDOLO; STEWART, 1998).

O “alfabeto” das enterotoxinas estafilocócicas se expandiu pela detecção de novos genes que codificam as enterotoxinas SEK, SEL, SEM, SEN, SEO, SEP, SEQ, SER, SEU e SEV (JAURRAD *et al.*, 2001; KURODA *et al.*, 2001; LETERTRE *et al.*, 2003; OMOE *et al.*, 2003; ORWIN *et al.*, 2001). Além disso, algumas variantes também foram relatadas para SEC, SEG, SEI e SEU (ABE *et al.*, 2000; LETERTRE *et al.*, 2003; OMOE *et al.*, 2002).

Aproximadamente 95% dos casos de intoxicação alimentar estafilocócica são causados pelas SEs dos tipos SEA a SEE (CREMONESI *et al.*, 2005). Os 5% restantes de intoxicações devem estar associadas com outras SEs identificadas. A incidência de casos de intoxicação alimentar devido a novos tipos de enterotoxinas estafilocócicas já foi relatada na

França (ROSEC; GIGAUD, 2002), Japão (OMOE *et al.*, 2002) e Inglaterra (MCLAUHLIN *et al.*, 2000). Apenas três das enterotoxinas, SEG-SEI, assim como as enterotoxinas SEA-SEE, têm causado vômito após administração oral a primatas (KÉROUANTON *et al.*, 2007).

2.6.1 Aspectos Genéticos

Os genes que codificam as enterotoxinas já foram estudados, e suas denominações iniciam com as letras *se* de enterotoxina estafilocócica ou *ent* de enterotoxina, sendo a primeira forma a mais utilizada na atualidade (FREITAS *et al.*, 2004).

Os genes que codificam as enterotoxinas são carregados por diferentes elementos genéticos. A associação com elementos genéticos móveis implica numa transferência horizontal dos genes destes superantígenos entre isolados de *S. aureus* e num importante papel na evolução de *S. aureus* como um patógeno (BLAIOTTA *et al.*, 2006).

O gene para SEA (*sea*) é composto de 771pb e codifica uma proteína de 27,1 KDa (BETLEY; MEKALANOS, 1988; HUANG *et al.*, 1987). SEA é expressa na metade da fase exponencial do crescimento dos estafilococos (TREMAINE; BROCKMAN; BETLEY, 1993), sendo a detecção do gene *sea* em isolados de *S. aureus* importante, pois a SEA é tóxica em baixas concentrações (EVENSON *et al.*, 1988). Uma quantidade tão pequena como 100-200ng de SEA pode produzir sintomas (ASAO *et al.*, 2003). Além disso, é a enterotoxina mais comum envolvida em intoxicações alimentares seguida por SED e SEB (BALABAN; RASOOLY, 2000). O gene *seb* consiste de 798 nucleotídeos e codifica uma proteína de 31,4 KDa (JOHNS JR; KHAN, 1988). O gene *seb* é cromossomal em isolados clínicos de *S. aureus* envolvidos em intoxicação alimentar, embora seja carregado por um plasmídeo em outros isolados bacterianos (SHAFER; IANDOLO, 1978; SHALITA; HERTMAN; SAND, 1977). A enterotoxina estafilocócica B pode ser considerada como uma potencial arma biológica (DINGES; ORWIN; SCHLIEVERT, 2000).

A enterotoxina SEC é heterogênea e contém algumas variantes, designadas SEC1, SEC2, SEC3, SEC_{bovina} e SEC_{ovina}. Estas foram classificadas com base nas diferenças antigênicas e no hospedeiro animal com o qual elas estão associadas (MARR *et al.*, 1993). O gene *sec1* contém 801pb e codifica uma proteína de 27,4 KDa (BOHACH; SCHLIEVERT, 1987), o gene *sec2* contém 801pb e codifica uma proteína de 26 KDa (BOHACH; SCHLIEVERT, 1989) e o gene *sec3* contém 798pb e codifica uma proteína de 27,4 KDa

(COUCH; BETLEY, 1989). SEC2 e SEC3 são os subtipos de SECs mais frequentes em surtos de intoxicação alimentar (CHEN *et al.*, 2001). SEC é a enterotoxina mais comumente associada com produção leiteira bovina, ovina e caprina (HIROOKA *et al.*, 1988).

A baixa produção de SED é significativa, pois pouca quantidade desta enterotoxina (100 a 200 ng) pode causar doença, especialmente em crianças e idosos (KOKAN; BERGDOLL, 1987). O gene *sed* foi localizado no plasmídeo da penicilinase de 27,6 kb e codifica uma proteína de 26,3 KDa (BAYLES; IANDOLO, 1989). O gene para SEE (*see*) codifica uma proteína de 29 KDa (COUCH; SOLTIS; BETLEY, 1988) que apresenta homologia com SEA e SED, no entanto, maior homologia (81%) com SEA (BALABAN; RASOOLY, 2000).

Jarraud *et al.* (2001) mostraram que os genes das enterotoxinas SEG e SEI coexistem num elemento genético comum, um cluster gênico de enterotoxina (*egc*), com três outros genes, *sem*, *sen* e *seo* cuja propriedade emética é incerta mas com atividade superantigênica comprovada, e dois pseudogenes, ϕ *ent1* e ϕ *ent2*. Os genes *seg* e *sei* codificam proteínas de 27 KDa (SEG) e 24,9 KDa (SEI), ambas com propriedades de proliferação de células T e ação emética (MUNSON *et al.*, 1998). Estão presentes em *S. aureus* num mesmo fragmento de DNA com 3,2 kb, orientados em *tandem* (JAURRAD *et al.*, 1999).

Análise subsequente do segmento intergênico entre *seg* e *sei* em alguns isolados de *S. aureus* resultou na descoberta do gene *seu*, que codifica para outra enterotoxina homóloga, SEU. Letertre *et al.* (2003) descreveram a enterotoxina SEU, que aparentemente surgiu da fusão entre ϕ *ent1* e ϕ *ent2*. O envolvimento de SEG e SEI em surtos de intoxicação alimentar ainda não está claramente estabelecido (OMOE *et al.*, 2002).

SEH é uma enterotoxina com peso molecular de 27,3 KDa e ponto isoelétrico de 5,7, considerado ácido, diferentemente das demais SEs identificadas, que são neutras ou são proteínas básicas com pontos isoelétricos variando de 7,0 a 8,6 (SU; WONG, 1995). Ren *et al.* (1994) purificaram SEH de um isolado clínico de *S. aureus* de um paciente com TSS não menstrual que foi negativa para TSST-1. Su e Wong (1996) desenvolveram a técnica de ELISA para SEH e observaram que uma amostra envolvida em intoxicação alimentar produziu SEH, demonstrando que esta toxina é capaz de causar intoxicação alimentar e sintomas de TSS. O envolvimento de SEH em surtos de intoxicação alimentar estafilocócica parece bem estabelecido desde que foi recentemente detectada em produtos alimentares responsáveis por dois surtos (IKEDA *et al.*, 2005; JORGENSEN *et al.*, 2005a).

A caracterização do plasmídeo comportando o gene *sed* revelou a presença de uma ORF (Open Reading Frame - quadro aberto de leitura) a qual codifica a enterotoxina

estafilocócica J (SEJ) de 31,2 KDa. As ORF de *sed* e *sej* são orientadas em direções opostas no plasmídio (pIB485) e são separadas por 895 nucleotídeos (ZHANG; IANDOLO; STEWART, 1998). Omoe *et al.* (2003) relataram que plasmídios (pIB485) contendo os genes *sed* e *sej* também incluem o gene *ser*.

A análise da sequência de aminoácidos da proteína SER revelou alta homologia com a sequência SEG e desenvolvimento de atividade de superantígeno. Diferentes estudos mostraram que isolados de *S. aureus* podem comportar uma ou mais SEs simultaneamente. Um isolado de *S. aureus* comportando o plasmídio pIB485 contendo os genes *sed*, *sej* e *ser* demonstra que a intoxicação alimentar pode ser causada por um fenótipo complexo devido à presença de múltiplas SEs.

2.7 Toxina-1 da Síndrome do Choque Tóxico (TSST-1³)

A toxina-1 da síndrome do choque tóxico (TSST-1) de *S. aureus* é codificada pelo gene *tst*, localizado no cromossomo bacteriano dentro de elementos genéticos móveis de 15 a 19 kb denominados de ilhas de patogenicidade estafilocócica (LINDSAY *et al.*, 1998; RUZIN; LINDSAY; NOVICK, 2001). É provavelmente susceptível à clivagem pela pepsina, podendo ser menos estável no intestino em comparação com as SEs (DINGES; ORWIN; SCHLIEVERT, 2000).

Esta toxina é reconhecida como a principal causa da síndrome do choque tóxico (TSS⁴), que pode ser causada menos freqüentemente pelas enterotoxinas SEA, SEB, SEC ou SED (primariamente B e C1) (VOJTOV; ROSS; NOVICK, 2002). Também é responsável pela síndrome da morte súbita infantil e síndrome de Kawasaki (RUUD *et al.*, 2005). Casos de TSS por isolados de *S. aureus* positivos para SEG e SEI também foram documentados (JARRAUD *et al.*, 1999).

Jarraud *et al.* (1999) mostraram que 12 isolados de *S. aureus* obtidos de pacientes com a síndrome do choque tóxico e febre escarlatina estafilocócica possuíam apenas os genes *seg* e *sei*. Clinicamente é caracterizada por febre, rachaduras cutâneas difusas, descamação, particularmente dos pés e palmas das mãos (Figura 2A-B), hipotensão e envolvimento multiorgânico (DINGES; ORWIN; SCHLIEVERT 2000). Se não tratada adequada e

³ TSST-1: Toxic Shock Syndrome Toxin-1

⁴ TSS: Toxic Shock Syndrome

imediatamente, um choque letal pode se desenvolver dentro de 24 horas após o início dos sintomas (DINGES; ORWIN; SCHLIEVERT, 2000; LOWY, 1998).

Pode ser dividida amplamente em casos menstruais (envolvendo infecção vaginal em mulheres menstruadas) e casos não menstruais. Síndrome do choque tóxico menstrual é geralmente associada ao uso de tampão absorvente; os tampões aumentam a concentração de oxigênio vaginal, que estimula a produção de TSST-1 por *S. aureus* que normalmente reside na vagina. Tampões de alta absorção também sequestram íons magnésio, que causam depleção de nutriente na vagina e podem estimular condições de fase log tardia para *S. aureus* residente, induzindo a secreção de TSST-1 (SCHLIEVERT, 1993).

O início de TSS não-menstrual é comumente relatada para infecções oportunistas por *S. aureus* na vagina e em outras partes do organismo. Casos não menstruais são geralmente associados com cirurgia, infecção por influenza, uso de diafragma e infecções de pele. A maioria dos casos menstruais (90%) é causada por TSST-1 e casos não menstruais são igualmente divididos entre TSST-1 e SEs (BOHACH *et al.*, 1990). Com o declínio nos casos relacionados aos tampões, a proporção de casos não menstruais tem aumentado significativamente de 9% de casos de TSS entre 1979 e 1980 para 41% de casos entre 1987 e 1996 (WILSON *et al.*, 2007).

A TSST-1 é um polipeptídeo de 29,1 KDa, com propriedades biológicas comuns a outras exotoxinas pirogênicas e superantigênicas, porém apenas as SEs têm atividade emética. A proteína madura é uma cadeia polipeptídica com um peso molecular de 22 KDa (DINGES; ORWIN; SCHLIEVERT 2000). A TSST-1 pode ser capaz de estimular a secreção de citocinas por monócitos na ausência de proliferação de linfócitos T (SCHLIEVERT, 1993).

Para que ocorra a síndrome do choque tóxico é necessário que o paciente esteja infectado por *S. aureus* produtor da toxina-1 da síndrome do choque tóxico e que esta toxina consiga atingir a circulação sanguínea (HERZER, 2001).



Figura 2A-B - Sinais da síndrome do choque tóxico estafilocócico.
Fonte: Sauer (1991).

2.8 Toxinas Esfoliativas (ETs⁵)

A toxina esfoliativa, produzida por *S. aureus*, é o principal agente causador da síndrome estafilocócica da pele escaldada (SSSS⁶), ou doença de Ritter, e impetigo bolhoso (BI⁷) (HAYAKAWA *et al.*, 1998; MELISH, 1971), termo utilizado para uma coleção de doenças bolhosas da pele (LADHANI *et al.*, 1999). A doença afeta primariamente neonatos e crianças, embora adultos com infecções latentes também sejam susceptíveis (LADHANI *et al.*, 2001).

SSSS pode apresentar duas principais formas clínicas, dependendo da idade do paciente (LADHANI, 1999). O impetigo bolhoso, a forma localizada de SSSS, é a mais comum e pode ocorrer em qualquer idade. Começa com infecção de pele por uma linhagem de *S. aureus* produtora de ETs. Ocorrem lesões bolhosas com exsudato purulento, sinais locais de inflamação e necrose, e *S. aureus* pode geralmente ser isolado das lesões (LISA; PLANO, 2004).

A forma generalizada de SSSS (doença de Ritter) afeta neonatos, crianças e raramente adultos. Esta condição pode se iniciar com febre e eritema, seguida por um sinal positivo de Nikolsky e progresso para a formação de uma grande bolha e esfoliação de áreas extensas da epiderme revelando uma superfície úmida e brilhante com aparência semelhante à pele escaldada (ARBUTHNOTT *et al.*, 1990) (Figura 3A-B).

A mortalidade em crianças é geralmente associada com infecções secundárias e outras complicações originadas da perda da epiderme superior da pele ou falha no tratamento (CRIBIER; PIEMONT; GROSSHANS, 1994; ITO *et al.*, 2002).

As duas principais isoformas ET de *S. aureus*, ETA e ETB, biológica e sorologicamente distintas, são primariamente responsáveis pelas manifestações de SSSS e BI em humanos (WILEY; ROGOLSKY, 1977). Há diferenças geográficas relatadas sobre a prevalência das toxinas particulares que são expressas (LISA; PLANO, 2004). Na América do Norte, Europa e África, ETA é a toxina esfoliativa predominante (ADESIYUN; LENZ; SCHAAL, 1991; LADHANI, 2001). Em contraste, ETB foi relatada sendo mais comum no Japão (KONDO *et al.*, 1975).

⁵ ETs: Exfoliative Toxins

⁶ SSSS: Staphylococcal scalded skin syndrome

⁷ BI: Bullous Impetigo

A atividade da ETA é estável, mesmo após aquecimento a 100°C por 20 minutos sendo inativada apenas por aquecimento a 100°C durante 40 minutos. No entanto, ETB e ETC são sensíveis ao aquecimento de 60°C por 15 a 30 minutos (SATO *et al.*, 1994). Ladhani *et al.* (1999, 2003) têm sugerido que ETB é mais freqüentemente isolada do que ETA em crianças com SSSS generalizada.

Sato *et al.* (1994) descreveram as características biológicas e sorológicas da toxina esfoliativa ETC a partir de amostra de *S. aureus* isolada de cavalo com infecções cutâneas, a qual não foi associada com doença em humano (LISA; PLANO, 2004). Yamaguchi *et al.* (2002) identificaram a seqüência do gene da toxina esfoliativa ETD numa ilha de patogenicidade de isolados clínicos de *S. aureus*. O significado clínico de ETC ou ETD não foi estabelecido.

As ETs são codificadas por elementos genéticos móveis (NOVICK, 2003) possibilitando a transferência horizontal destes fatores de virulência (LISA; PLANO, 2004). O gene que codifica ETA está localizado no cromossomo bacteriano dentro de um fago temperado de 43kb, Φ ETA (YAMAGUCHI *et al.*, 2000). ETB é codificada em um plasmídio de aproximadamente 38kb (LEE *et al.*, 1987; YAMAGUCHI *et al.*, 2002). As ETs são reguladas pelo *locus* do gene regulador acessório estafilocócico *agr* (JI; BEAVIS; NOVICK, 1995; NOVICK, 2003).

As toxinas esfoliativas apresentam os seguintes pesos moleculares: ETA 26,9 KDa, ETB 27,2 KDa (LEE *et al.*, 1987; SATO *et al.*, 1994), ETC 27 KDa (SATO *et al.*, 1994) e ETD 27,2 KDa (YAMAGUCHI *et al.*, 2002). Além da toxina esfoliativa estar associada com a patogênese de infecções de pele estafilocócicas e ser produzida por *S. aureus* isolados de humanos envolvidos em casos clínicos (CHI *et al.*, 2006; MEHROTRA; WANG; JOHNSON, 2000), sua presença em amostras de leite já foi demonstrada (ENDO *et al.* 2003; HAYAKAWA *et al.* 1998).

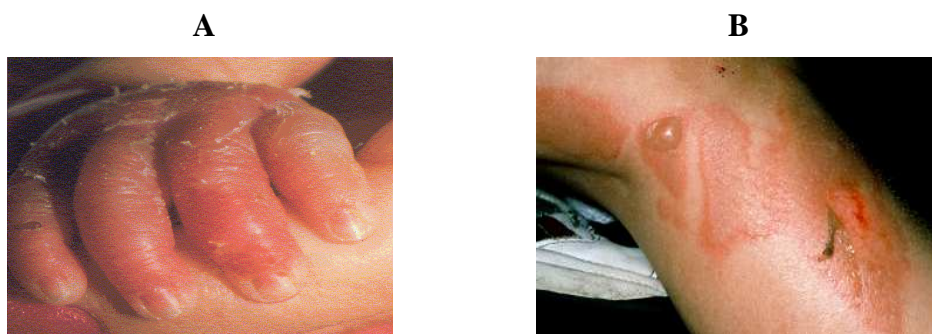


Figura 3A-B - Sinais da síndrome estafilocócica da pele escaldada.
Fonte: Science Photo Library (2007) e Tortora, Funke e Case (2000).

2.9 Uso de Antimicrobianos

O termo antibiótico provém de duas palavras gregas, “*anti*” e “*bio*”, significando “contrário à vida” e foi introduzido por Waksman em 1947, para designar a substância química de origem microbiana capaz de inibir o crescimento de microrganismos ou destruí-los. Os antibióticos em geral são compostos caracterizados pela alta atividade contra microrganismos patogênicos, relativamente baixa toxicidade para seres humanos e outros animais, e resistência à inativação por enzimas e fluidos corpóreos (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 1997; YOSHIDA JÚNIOR *et al.*, 2004).

Os antibióticos podem ser classificados quanto a sua atuação em bacteriostático, que causa apenas inibição do crescimento microbiano sem levar o microrganismo à morte, ou bactericida, que destrói o microrganismo por se ligar a algum alvo celular (KOROLKOVAS; BUCKHALTER, 1982).

A partir de 1950, quando os antibióticos passaram a ser amplamente utilizados, iniciou-se o fenômeno de resistência bacteriana (RAPINI *et al.*, 2004). Desde então, o problema de resistência aos antibióticos passou a representar importância considerável em Saúde Pública (NAWAZ *et al.*, 2002). Hoje, o desenvolvimento de resistência por certas bactérias patogênicas é mais rápido que a capacidade da indústria para produzir novas drogas (SOUZA, 1998).

A aquisição sucessiva de resistência à maioria das classes de agentes antimicrobianos, tais como, penicilinas, macrolídeos, aminoglicosídeos, cloranfenicol e tetraciclina tem tornado o tratamento e o controle de infecções estafilocócicas altamente difícil (GILL *et al.*, 2005).

A utilização muita difundida de metilina e outras penicilinas semi-sintéticas no final dos anos 60 induziu à emergência de *S. aureus* resistente a metilina (MRSA), que continua a persistir tanto em ambientes de cuidado à saúde como na comunidade (STEVENS, 2003). Atualmente, mais de 60% dos isolados de *S. aureus* são resistentes a metilina e alguns isolados têm desenvolvido resistência a mais de 20 diferentes agentes antimicrobianos (PAULSEN; FIRTH; SKURRAY, 1997).

A terapia efetiva permanente contra a maior parte das linhagens de estafilococos multirresistentes, incluindo MRSA, é o glicopeptídeo vancomicina (WALSH, 1999). Entretanto, a emergência em 1997 (CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 1997) de *S. aureus* com níveis intermediários de resistência à vancomicina e

à teicoplanina e a mais recente emergência de *S. aureus* com altos níveis de resistência à vancomicina (CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2002) tem limitado sua efetividade (GILL *et al.*, 2005). Tal *S. aureus* recebeu a denominação VISA (*Staphylococcus aureus* com resistência intermediária à vancomicina) e atualmente é denominado simplesmente de VRSA (*Staphylococcus aureus* vancomicina resistente).

A resistência antimicrobiana pode ser carregada pelo cromossomo bacteriano ou pelo plasmídio (FOOD AND DRUG ASSOCIATION, 2002). Em *S. aureus*, a resistência múltipla resulta da presença de plasmídios, mutações cromossômicas e de elementos transponíveis (HIRAMATSU *et al.*, 2001). Evidências diretas indicam que o uso de antimicrobianos em animais seleciona bactérias resistentes que podem ser transferidas para humanos através dos alimentos ou contato direto com os animais (AARESTRUP, 1999).

Segundo Rajala-Schultz *et al.* (2004) as bactérias resistentes que são encontradas em animais produtores de alimentos, podem contaminar os produtos alimentícios e serem transferidas para humanos através da cadeia alimentar. No trato gastrointestinal elas podem transferir genes que conferem a resistência antimicrobiana a outras bactérias (WITTE, 2000) da própria espécie ou de espécies não relacionadas patogênicas ou não (FOOD AND DRUG ASSOCIATION, 2002).

A produção leiteira vem baseando-se principalmente na terapêutica alopática, e o aumento do uso de antibióticos ocorre em função da persistência de certos microrganismos resistentes. Dentre eles o *S. aureus* é um dos mais patogênicos e causa uma infecção geralmente crônica diminuindo gradativamente a produção leiteira, sendo de difícil controle uma vez que apresenta geralmente resistência à penicilina e outros antibióticos (BENITES *et al.*, 2002; COSTA *et al.*, 2000).

2.10 Epidemiologia Molecular na Investigação das Toxinas Estafilocócicas

Diferenciação intraespecífica de *S. aureus* é essencialmente designada para investigações epidemiológicas durante as doenças, ou como parte de um sistema de vigilância contínuo, e pode ser conduzida por procedimentos fenotípicos e genotípicos (TENOVER *et al.*, 1994). Tais métodos são baseados na premissa de que organismos clonalmente relacionados compartilham particularidades que podem diferenciá-los de outros organismos não relacionados (FUEYO *et al.*, 2001).

Atualmente, existem muitos métodos diferentes para tipagem de bactéria, mas nem todos os métodos dividem grupos de linhagens em um padrão similar e cada método mostra diferenças no desenvolvimento e critério de conveniência (FUEYO *et al.*, 2001).

Nos últimos anos, verificou-se um aumento significativo no desenvolvimento de métodos genéticos para detecção e caracterização de bactérias patogênicas em alimentos. Particular relevância para a indústria de processamento alimentar é a habilidade de algumas linhagens de *S. aureus* em produzir enterotoxinas termoestáveis que causam intoxicação alimentar, uma das mais prevalentes causas de gastroenterites no mundo inteiro (DINGES ORWIN; SCHLIEVERT, 2000); por isso, a detecção de enterotoxinas é epidemiologicamente essencial (SHARMA; CATHERINE; DODD, 2000).

As SEs podem ser rotineiramente detectadas por ELISA, imunodifusão, radioimunoensaio e aglutinação em látex, mas a viabilidade destes métodos é usualmente limitada a testes comerciais para SEA, SEB, SEC, SED e SEE (CREMONESI *et al.*, 2005; LETERTRE *et al.*, 2003). Além disso, a sensibilidade e especificidade desses métodos sempre dependem da obtenção de quantidades detectáveis de toxinas e podem variar significativamente com a pureza dos reagentes. Esses testes levam de 3 a 24 horas para cada detecção, com sensibilidade de 0,25-1,0 ng/mL havendo ainda a possibilidade de resultados falso-positivos (CHEN *et al.*, 2001).

Métodos baseados na amplificação de DNA (PCR) podem demonstrar a presença de linhagens de *S. aureus* toxigênicas, antes da expressão das toxinas, com base nas seqüências específicas dos genes e desta forma detectarem a fonte potencial de contaminação (HOLECKOVÁ *et al.*, 2002).

A vantagem dos métodos baseados em PCR se relaciona à capacidade de detectar genes que determinam a produção das toxinas estafilocócicas inclusive a partir de alimento tratado por aquecimento, em virtude do DNA permanecer inalterado, demonstrando o potencial de toxigenicidade de *S. aureus* (TSEN; CHEN, 1992).

Devido às informações sobre a seqüência de DNA das SEs (MCLAUCHLIN *et al.*, 2000; REN *et al.*, 1994; SU; WONG, 1995, 1997), a PCR torna-se um método para a detecção dos genes destas toxinas (BECKER; ROTH; PETERS, 1998), mostrando-se uma técnica simples e reprodutível, funcionando como uma ferramenta genética para estudos epidemiológicos (FREITAS *et al.*, 2004). Métodos baseados em PCR (Figura 4) para determinar a ocorrência de microrganismos patogênicos e toxigênicos em alimentos são amplamente reconhecidos como capazes de diminuir o tempo de detecção e aumentar a especificidade e sensibilidade dos resultados (ERCOLINI *et al.*, 2004).

Vários isolados de *S. aureus* podem ser testados para a produção de enterotoxina em casos onde sintomas típicos de intoxicação são observados (LONCAREVIC *et al.*, 2004). A contínua identificação de novas SEs e o requerimento de métodos rápidos na investigação de intoxicações alimentares têm levado ao desenvolvimento de técnicas para pesquisa de um único gene como a PCR-Uniplex (MCLAUCHLIN *et al.*, 2000) e detecção simultânea dos genes *se*, como a PCR-Multiplex (MONDAY; BOHACH, 1999).

A PCR-Multiplex é uma variação da técnica de PCR, onde se utilizam vários pares de iniciadores específicos para diferentes seqüências-alvo, numa mesma reação de amplificação. Diversos sistemas de PCR-Multiplex foram desenvolvidos para o estudo do perfil dos genes toxigênicos que economizam tempo e trabalho para detectar muitos genes simultaneamente (MONDAY; BOHACH, 1999; OMOE *et al.*, 2005; SHARMA; CATHERINE; DODD, 2000).

Este procedimento permite que várias seqüências de uma mesma molécula de DNA sejam lidas, ou ainda, que múltiplos fatores de virulência de um mesmo patógeno sejam pesquisados (MARTINEZ; TADDEI, 2004). A técnica de PCR-Multiplex é utilizada para investigar diferentes genes toxigênicos em isolados de *S. aureus*, obtidos de quadros de intoxicação alimentar, de leite e queijo (FREITAS *et al.*, 2006; OMOE *et al.* 2005).

A PCR é apenas capaz de confirmar a existência dos genes *se* em isolados de *S. aureus*, não determinando a expressão dos mesmos. A técnica da Reação em Cadeia da Polimerase Transcriptase Reversa (RT-PCR⁸) oferece uma maneira rápida, versátil e sensível de se analisar a expressão de um gene-alvo, utilizando o RNAm como molde para a síntese de DNAc obtido pela ação da enzima transcriptase reversa (Figura 5A-E). A próxima etapa envolve a amplificação do DNAc através de uma reação de PCR padrão (MARTINEZ; TADDEI, 2004).

⁸ RT-PCR: Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction

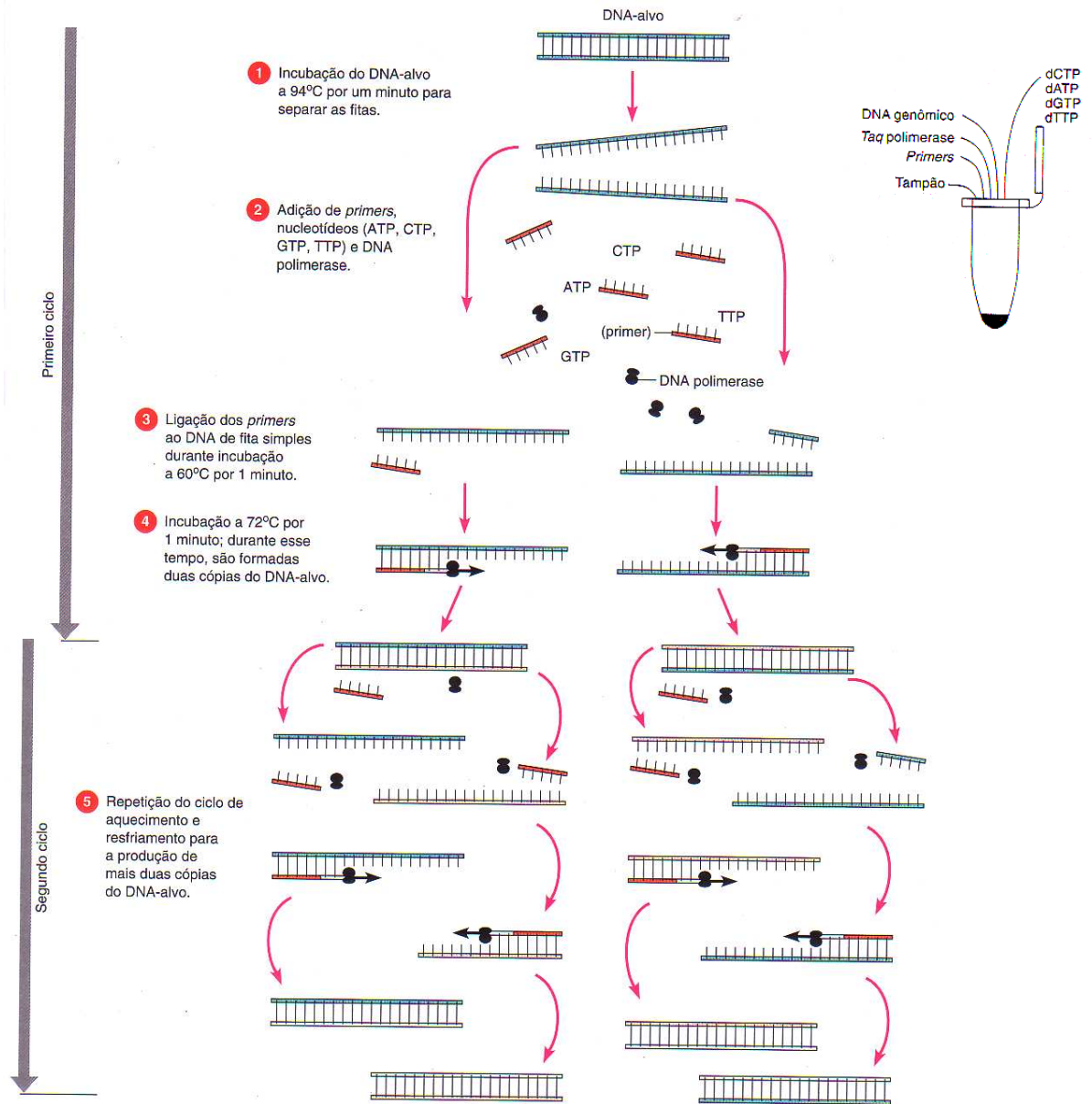


Figura 4 - Esquema da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

Fonte: Tortora *et al.* (2000).

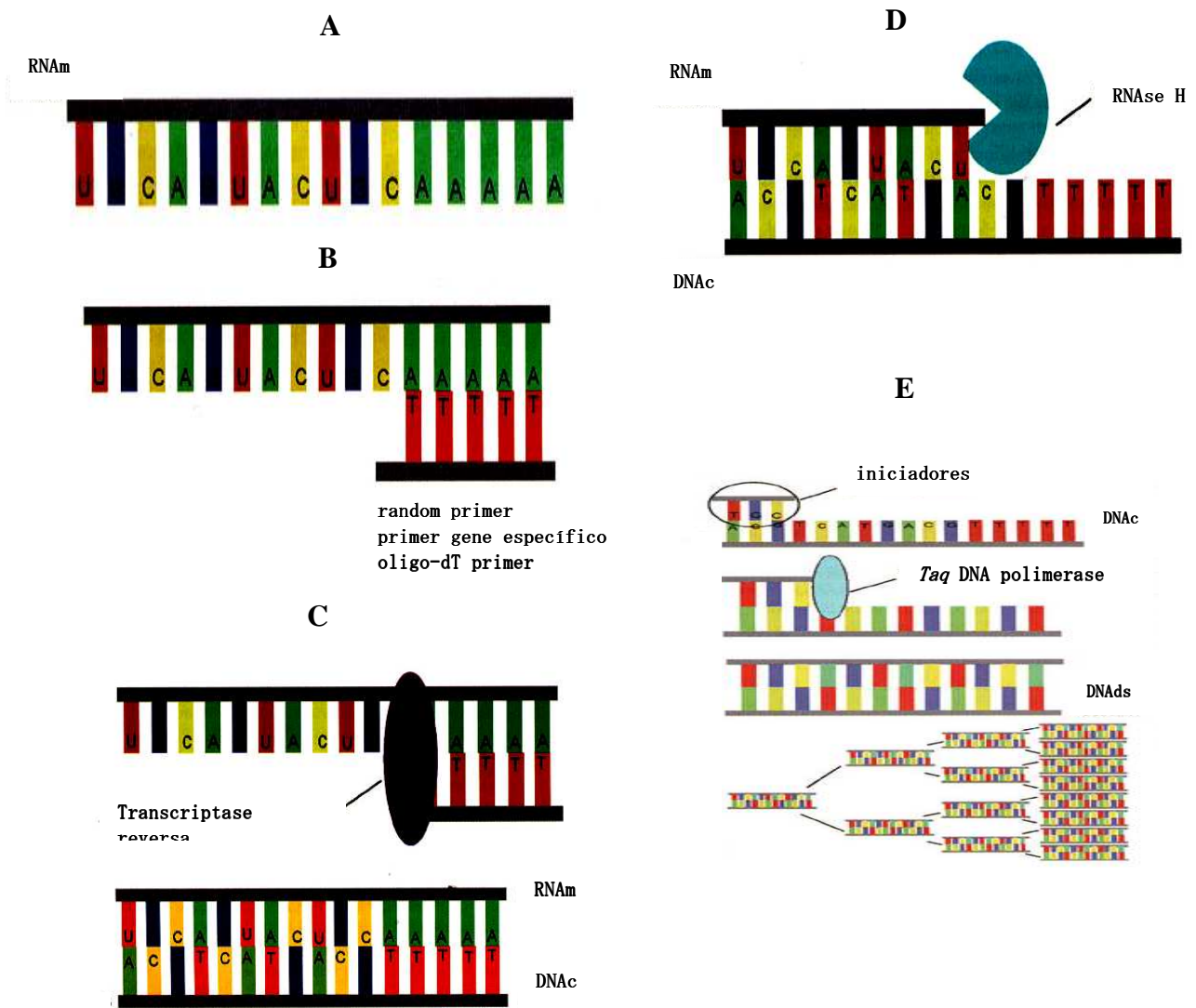


Figura 5 - Esquema da Reação em Cadeia da Polimerase Transcriptase Reversa (RT-PCR).

Fonte: Kendall e Riley (2000).

Nota: Fita molde de RNAm (A), Anelamento do *primer* ao RNAm para dar início à síntese do DNAc (B), A primeira fita de DNAc é sintetizada usando-se a transcriptase reversa (RT) (C), A fita molde de RNA é removida por tratamento com RNase H (D), Reação de PCR utilizando DNAc (E).

2.11 Polimorfismo do Gene da Coagulase (*coa*)

A produção da enzima coagulase é o principal critério usado pela microbiologia clínica para a identificação de *S. aureus* isolados de infecções humanas. Apesar de dados conflitantes a respeito da importância da coagulase como um fator de virulência (SU *et al.*,

1999), esta é apontada como a primeira linha de defesa do *S. aureus* (MARTINEZ *et al.*, 2001; QUINN, 1994).

A coagulase é produzida extracelularmente por células de *S. aureus* e reage com a protrombina, simultaneamente transformando-a em staphylostrombina. Este complexo atua diretamente sobre o fibrinogênio, convertendo-o à fibrina, que resulta no revestimento do plasma. A coagulase também pode reagir com o fibrinogênio independentemente da protrombina (MCDEVITT; VAUDAUX; FOSTER, 1992). Acredita-se que a expressão do gene *coa* aumenta o crescimento bacteriano e promove a infecção em face dos mecanismos de defesa do hospedeiro, tais como a fagocitose (AARESTRUP; DANGLER; SORDILLO, 1995).

De acordo com Bennett (1996), a positividade para a enzima coagulase foi usada para indicar patogenicidade de um isolado toxigênico e a presença da enzima termonuclease, sugerida como indicador mais confiável dessa enterotoxigenicidade. Segundo Bergdoll (1989), se um isolado apresenta resultados positivos para a produção das enzimas coagulase e termonuclease, pode ser considerado como potencialmente produtor de enterotoxinas.

Existem numerosas formas alélicas do gene da coagulase (*coa*) em *S. aureus* (IANDOLO, 1990). A análise da seqüência nucleotídica do gene *coa* clonado a partir de três diferentes isolados de *S. aureus* revelou a existência de um segmento variável dentro da região 3' codificante (KAIDA *et al.*, 1989; PHONIMDAENG *et al.*, 1990). Esta região variável constituída de seqüências curtas repetidas (SRRs⁹) em *tandem* de 81 pb é utilizada em diversos estudos epidemiológicos para subtipar isolados de *S. aureus* baseado no número de seqüências repetidas e pela localização de sítios de restrição para endonucleases específicas (Figuras 6 e 7), permitindo aumentar o poder discriminatório da técnica (GOH *et al.*, 1992).

Nos últimos anos, numerosas técnicas moleculares são usadas para identificar e comparar subtipos de *S. aureus* (RODRIGUES DA SILVA; DA SILVA, 2005). A técnica da PCR é utilizada para estabelecer a relação clonal em estudos epidemiológico-moleculares e permite subdividir os isolados de *S. aureus* baseando-se no polimorfismo do gene da coagulase (*coa*), utilizando iniciadores específicos que apresentam fragmentos com diferentes pesos moleculares (HOOKEY; RICHARDSON; COOKSON 1998; VIEIRA-DA-MOTTA; FOLLY; SAKYIAMA, 2001). Os resultados da pesquisa epidemiológica baseada na análise do gene *coa* sugerem que poucos subtipos de *S. aureus* são responsáveis pela maior parte dos

⁹ SRRs: Short Sequence Repeats

casos de mastite bovina (AARESTRUP; DANGLER; SORDILLO, 1995; SCHLEGELOVÁ *et al.*, 2003; SU *et al.*, 1999).

Dentre os métodos moleculares, muitos autores consideram a tipagem do gene *coa* uma ferramenta epidemiológica de significado simples e suficientemente reprodutível, específica e discriminatória, quando empregada na subtipagem de *S. aureus* isolados de fontes humanas e animais (AARESTRUP; DANGLER; SORDILLO, 1995; SANTOS *et al.*, 2003; SCHLEGELOVÁ *et al.*, 2003; SHOPSIN *et al.*, 2000).

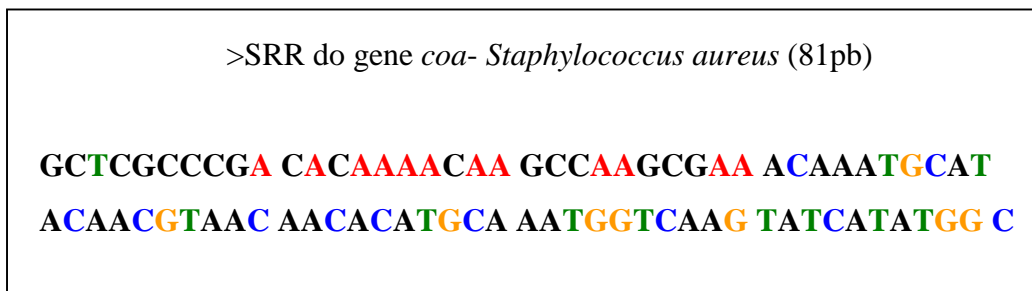


Figura 6 - Esquema da região da seqüência repetitiva do gene da coagulase (*coa*).
Fonte: Shopsin *et al.*, (2000).



Figura 7 - Esquema representativo dos sítios de restrição da enzima *AluI* dentro do gene *coa* e localização do anelamento dos primers COAG2 e COAG3.
Fonte: Goh *et al.* (1992).

3 JUSTIFICATIVA

O leite é um alimento básico utilizado na dieta humana em toda faixa etária, principalmente por ser um dos produtos mais completos do ponto de vista nutricional (LEITE *et al.*, 2002). Possui alta digestibilidade, indiscutível valor biológico e excelente fonte de proteínas e cálcio (GARCIA *et al.*, 2000).

O queijo de coalho é um dos mais tradicionais queijos produzidos no Nordeste brasileiro e devido à simplicidade de sua tecnologia, é amplamente fabricado nesta região. É também um importante derivado do leite, apreciado tanto pelo seu valor nutritivo como pelo seu sabor que atende aos mais exigentes paladares. No entanto, as condições de processamento, armazenamento e comercialização podem comprometer suas características organolépticas, bem como torná-lo impróprio para consumo, em virtude da contaminação por microrganismos responsáveis por toxinfecções alimentares (RIBEIRO DE SÁ *et al.*, 2003).

O *S. aureus* é um dos mais importantes causadores de intoxicações alimentares, assumindo relevância para a Saúde Pública, em virtude do risco potencial de sua veiculação ao homem através do leite e derivados que podem conter enterotoxinas termoestáveis pré-formadas nestes alimentos (SENA, 2000).

Além das enterotoxinas, alguns isolados de *S. aureus* produzem outras toxinas de interesse humano como a toxina-1 da síndrome do choque tóxico (TSST-1) (DINGES; ORWIN; SCHLIEVERT, 2000) e toxinas esfoliativas (ETA e ETB) (LEE *et al.* 1987) causadoras da síndrome estafilocócica da pele escaldada.

A produção da enzima coagulase é um dos critérios usados para identificação de *S. aureus*. Embora o teste da coagulase em tubo seja o teste padrão, vários isolados não são tipados pela técnica de produção desta enzima (AARESTRUP; DANGLER; SORDILLO, 1995). Em vista disso, análises moleculares do gene da coagulase estão sendo empregadas como teste de caráter definitivo (VIEIRA-DA-MOTTA; FOLLY; SAKYIAMA, 2001).

A análise do gene da coagulase (*coa*) através da PCR é aplicada para subdividir as amostras de *S. aureus* baseada no polimorfismo do gene *coa*, utilizando iniciadores específicos que geram fragmentos de diferentes tamanhos dependendo da amostra (VIEIRA-DA-MOTTA; FOLLY; SAKYIAMA, 2001).

A resistência bacteriana a antibióticos é um sério problema do ponto de vista clínico e da Saúde Pública (NAWAZ *et al.*, 2002), pois bactérias resistentes a antibióticos podem ser transmitidas ao homem pela ingestão de alimentos contaminados. Há evidências de que o

tratamento indiscriminado de animais com antibióticos torne seus produtos e derivados, fontes para resistência aos antibióticos na espécie humana (OLIVEIRA; MOTA; SOUZA, 2002).

O seqüenciamento dos genes codificadores de todas as SEs identificadas têm dado a oportunidade para a detecção e diferenciação de todos os genes *se* pela técnica de PCR. A contínua identificação de novas SEs e o requerimento de métodos rápidos na investigação de intoxicações alimentares têm levado ao desenvolvimento de métodos para a detecção simultânea de todos os genes *se*, como a técnica de PCR-Multiplex (MONDAY; BOHACH, 1999).

Os genes *se* podem ser transcritos em RNAm e a conseqüente produção da toxina em níveis suficientes, pode causar intoxicação alimentar ou outras doenças pelos isolados portadores desses genes (OMOE *et al.*, 2002).

Devido à riqueza em nutriente e fácil acessibilidade, o leite e o queijo constituem alimentos importantes na dieta da população e a contaminação destes alimentos por *S. aureus* representa um risco para a Saúde Pública, uma vez que esta bactéria é freqüentemente envolvida em doenças de origem alimentar e principalmente no que se refere às suas toxinas. A aplicação de técnicas moleculares na detecção das toxinas estafilocócicas é um passo relevante para se caracterizar rapidamente estas toxinas, além de gerar informações que possam contribuir para a proteção à saúde dos consumidores.

4 PERGUNTA CONDUTORA

Qual a frequência, distribuição e expressão dos genes toxigênicos em *S. aureus* isolados de amostras de leite e queijo de coalho em municípios da região Agreste de Pernambuco e qual a correlação destes genes com o perfil genotípico do gene da coagulase?

5 HIPÓTESES

- a) É freqüente a presença dos genes responsáveis pela produção das toxinas estafilocócicas em isolados de *S. aureus* provenientes de amostras de leite e queijo de coalho em propriedades leiteiras de municípios da região Agreste de Pernambuco;
- b) Existe uma correlação entre o perfil genotípico do gene da coagulase com o perfil genotípico dos genes toxigênicos;
- c) Os genes toxigênicos distribuídos nos isolados de *S. aureus* provenientes das amostras de leite e queijo de coalho são expressos isoladamente ou em associação;
- d) Não existe associação entre o perfil genotípico do gene da coagulase e dos genes toxigênicos com os padrões de resistência e sensibilidade aos antimicrobianos entre os isolados de *S. aureus* de municípios da região Agreste de Pernambuco.

6 OBJETIVOS

6.1 Objetivo Geral:

Caracterizar os *S. aureus* isolados de leite e queijo de coalho em municípios da região Agreste de Pernambuco quanto à presença de diferentes toxinas.

6.2 Objetivos Específicos:

- a) Isolar e identificar fenotipicamente os *S. aureus* obtidos de leite e queijo de coalho de propriedades leiteiras da região Agreste de Pernambuco;
- b) Caracterizar o perfil de sensibilidade antimicrobiana dos *S. aureus* isolados de leite e queijo de coalho frente aos antibióticos mais utilizados na medicina humana e veterinária;
- c) Pesquisar a presença dos genes responsáveis pela produção de toxinas em isolados de *S. aureus* provenientes de leite e queijo de coalho;
- d) Investigar a expressão dos genes toxigênicos nos isolados de *S. aureus* provenientes de leite e queijo de coalho;
- e) Correlacionar a tipagem pelo gene da coagulase com os genes toxigênicos nos *S. aureus* isolados de leite e queijo de coalho.

7 MATERIAL E MÉTODOS

7.1 Isolamento Microbiológico e Identificação Fenotípica dos *Staphylococcus aureus*

Os *S. aureus* foram isolados a partir de amostras de leite e queijo de coalho obtidas por demanda espontânea em propriedades de exploração leiteira de cinco municípios da região Agreste de Pernambuco (São Bento do Una, Angelim, Caetés, Correntes e Gravatá) (Figura 8). Para o diagnóstico fenotípico dos *S. aureus*, as colônias foram identificadas de acordo com as características de crescimento em Agar Base acrescido de 8% de sangue desfibrinado de ovino, produção de hemólise e pigmento.

As características morfológicas foram analisadas pelo método de Gram e provas bioquímicas como produção de catalase, coagulase livre e termonuclease (TNase Agar Azul de Ortotoluidina-DNA), segundo Silva, Junqueira e Silveira (1997). A produção de acetoina, fermentação da D-glicose (anaerobiose) e do D-manitol (aerobiose e anaerobiose) foi realizada segundo metodologia descrita por Mac Faddin (1980) e os isolados foram classificados de acordo com Baird-Parker (1990) (Figura 9A-H).

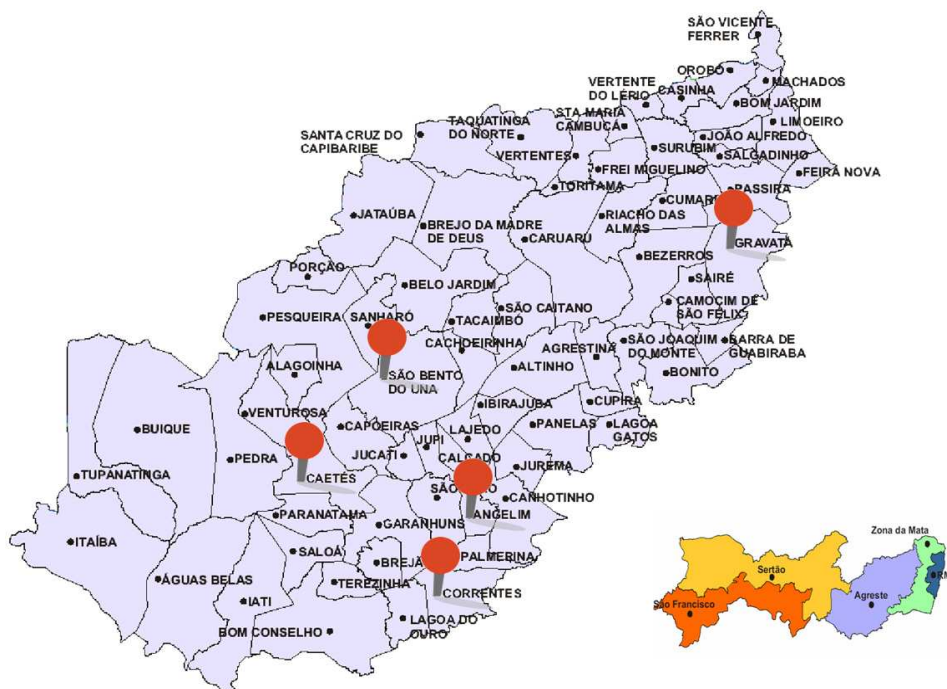


Figura 8 - Mesorregião Agreste dividida em municípios, destacando os municípios onde foram realizadas as coletas de leite e queijo de coalho.

Fonte: Pernambuco (2004).

Nota: Abaixo, mapa do estado de Pernambuco (Brasil), dividido em mesorregiões.

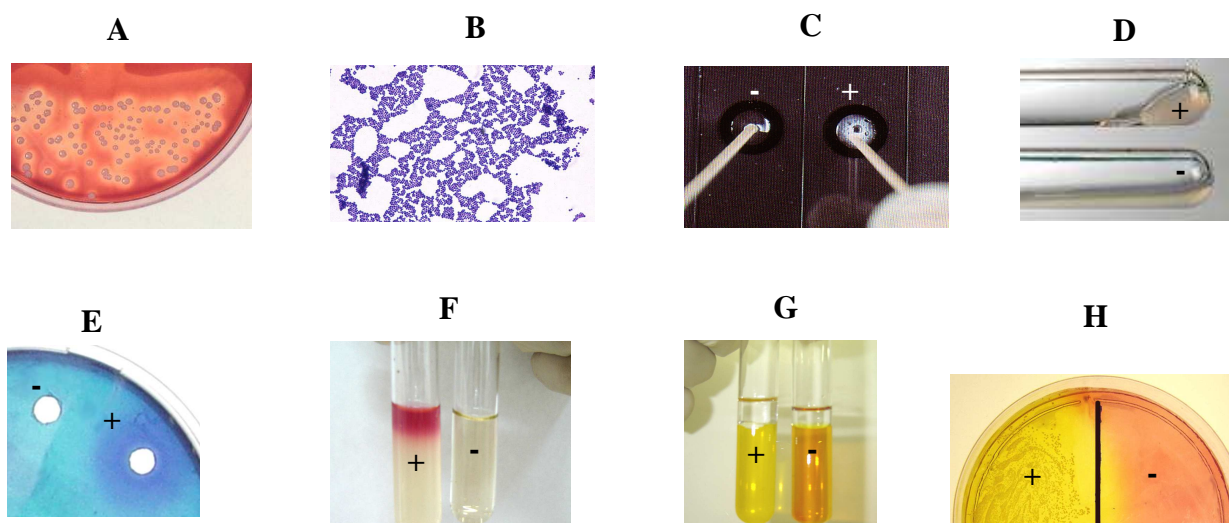


Figura 9 - Métodos fenotípicos utilizados na caracterização de *S. aureus*.

Fonte: Informações do autor.

Nota: Crescimento em Agar sangue (A), coloração de Gram (B), produção de catalase (C), coagulase livre (D), termonuclease (E), produção de acetoina (F), fermentação da glicose (G), fermentação do manitol (H).

7.2 Teste de Sensibilidade Antimicrobiana *in vitro*

Os isolados de *S. aureus* foram submetidos a testes de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* através da técnica de difusão em disco de acordo com a metodologia descrita por Bauer *et al.* (1966) em Agar Mueller-Hinton utilizando os seguintes discos impregnados de antibióticos: norfloxacina (10 ug), enrofloxacina (5 ug), sulfa + trimetoprim (25 ug), cloranfenicol (30 ug), tetraciclina (30 ug), eritromicina (15 ug), penicilina G (10 U), amoxicilina (10 ug), novobiocina (5 ug), oxacilina (1 ug), vancomicina (30 ug), bacitracina (10 U), lincomicina (2 ug) e gentamicina (10 ug). Os diâmetros das zonas de inibição por difusão de disco foram interpretados após 24h de incubação a 37°C, de acordo com o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2006).

7.3 Extração do DNA Genômico para Ensaio Baseado em PCR

O DNA genômico dos *S. aureus* foi extraído a partir de 1 mL de cultura crescida em meio BHI (Brain Heart Infusion, Biobrás), centrifugada a 14.000 rpm a 4°C. O sedimento foi

homogeneizado em 500 µL de tampão TE 10:1 juntamente com a adição de 10 µL de lisozima (10 mg/mL) e 10 µL of proteinase K (5 mg/mL) para lise da parede celular. A suspensão foi incubada a 60°C por 20 min seguida pela adição de 100 µL de tampão STE (2.5% SDS, 10 mM Tris-HCl, pH 8, 0.25 M EDTA) e incubações por 15 min a 60°C, 5 min a temperatura ambiente e 5 min no gelo. A reação foi neutralizada com 130 µL de acetato de amônio a 7.5 M, mantida no gelo por 15 min e então centrifugada por 5 min. Aproximadamente 700 µL do sobrenadante foram transferidos para um outro tubo e misturados com o mesmo volume de fenol-clorofórmio-álcool-isoamílico (25:24:1), seguido por centrifugação por 5 min. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, e o DNA foi precipitado com aproximadamente 420µL de isopropanol a -80°C por 30 min ou a -20°C por 24 h. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado, e o precipitado foi ressuspensionado em 10 µL de água deionizada estéril e mantido a -20°C. O DNA obtido foi quantificado usando o programa 1D Image Analysis Software, versão 3.5 da Kodak Digital Science, DC 120 zoom Digital Camera, após eletroforese em gel de agarose a 1% usando DNA do bacteriófago λ clivado com enzima de restrição *HindIII* como padrão.

7.4 Detecção dos Genes Toxigênicos através da Técnica da PCR

7.4.1 PCR - Multiplex

Duas reações de PCR-Multiplex foram realizadas, uma para pesquisa dos genes *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see* e outra para pesquisa dos genes *eta*, *etb* e *tst*.

As reações foram preparadas para um volume final de 25 µL contendo 20 pmol de cada *primer*¹⁰, 160 µM de cada dNTP, 3 mM de MgCl₂, 10 mM do Tris-HCl, pH 9,0, 50 mM de KCl, 30 ng de DNA genômico e 1,2U da *Taq* DNA polimerase (Invitrogen, Brasil). As amplificações foram realizadas em termociclador (Biometra) programado para 30 ciclos térmicos, cada um consistindo de 95°C por 1 min (desnaturação), 60°C por 1 min (anelamento) e 72°C por 2 min (extensão). Foram usadas como controle positivo as cepas

¹⁰ *Primer*: Iniciador específico

padrão de *S. aureus* FRI (Food Research Institute Madison, Wisconsin, EUA) 361 portadora dos genes *sec e sed* e FRI MN8 portadora do gene *tst*.

Os produtos de amplificação (*amplicons*) foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% (m/v), corados com brometo de etídio (1,5 mg/mL), visualizados e fotografados em transiluminador de UV. Os *primers* utilizados nas reações (Tabela 1) foram desenhados como descrito por Becker, Roth e Peters (1998).

7.4.2 PCR - Uniplex

As reações de PCR-Uniplex para a pesquisa dos genes *seg*, *seh*, *sei* e *sej* separadamente, consistiram de uma mistura de 10 pmol de cada *primer*, 160 µM de cada dNTP, 1,5 mM do MgCl₂, 10 mM do Tris-HCl pH 9,0, 50 mM de KCl, 20 ng do DNA genômico e 1 U da *Taq* DNA polimerase (Invitrogen, Brasil) para um volume final de 25µL. As amplificações para os genes *seg*, *seh* e *sej* foram realizadas em termociclador (Biometra) programado para 50 ciclos térmicos, cada um consistindo de 94°C por 3 min, 94°C por 30 seg, 60°C por 30 seg e 72°C por 30 seg. A amplificação do fragmento para o gene *sei* foi programada para 94°C por 30 seg, 60°C por 30 seg e 72°C por 60 seg (termociclador Biometra). Foi utilizada como controle positivo a cepa padrão de *S. aureus* FRI 361 portadora dos genes *seg*, *sei* e *sej*. Todas as cepas padrão utilizadas nas reações de PCR foram cedidas gentilmente pelo Laboratório de Enterotoxinas Estafilocócicas da Fundação Ezequiel Dias (FUNED-MG).

Os *amplicons* foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1% (m/v), corados com brometo de etídio (1,5 mg/mL), visualizados e fotografados em transiluminador de UV. Foram utilizados *primers* direcionados aos genes *seg*, *seh*, *sei* e *sej* (Tabela 1).

Tabela 1 - Sequências dos *primers* utilizados para a detecção dos genes responsáveis pela produção das toxinas (SEA-SEE, SEG-SEJ, ETA-ETB e TSST-1), tamanho esperado dos fragmentos e referências.

<i>Primers</i>	Seqüência (5' → 3')	Gene	Tamanho do <i>amplicon</i> (pb)	Referências
SEA-3b	cct ttg gaa acg gtt aaa acg	<i>sea</i>	127	Becker <i>et al.</i> , 1998
SEA-4b	tct gaa cct tcc cat caa aaa c	<i>seb</i>	477	Becker <i>et al.</i> , 1998
SEB-1c	tcg cat caa act gac aaa cg			
SEB-4b	gca ggt act cta taa gtg cct gc	<i>sec</i>	271	Becker <i>et al.</i> , 1998
SEC-3b	ctc aag aac tag aca taa aag cta gg			
SEC-4b	tca aaa tcg gat taa cat tat cc	<i>sed</i>	319	Becker <i>et al.</i> , 1998
SED-3b	cta gtt tgg taa tat ctc ctt taa acg			
SED-4b	tta atg cta tat ctt ata ggg taa aca tc	<i>see</i>	178	Becker <i>et al.</i> , 1998
SEE-3b	cag tac cta tag ata aag tta aaa caa gc			
SEE-2c	taa ctt acc gtg gac cct tc	<i>tst</i>	445	Becker <i>et al.</i> , 1998
TST-3	aagccctttgttgcttgcg			
TST-6	atcgaactttggcccatacttt	<i>eta</i>	119	Becker <i>et al.</i> , 1998
ETA-3b	ctagtgcattgttattcaagacg			
ETA-4b	tgcattgacaccatagtagtatttc	<i>etb</i>	262	Becker <i>et al.</i> , 1998
ETB-3b	acg gct ata tac att caa ttc aat g			
ETB-4b	aaa gtt att cat tta atg cac tgt ctc	<i>seg</i>	400	Rosec; Gigaud, 2002
SEG-1	acgtctccacctgttgaagg			
SEG-2	tgagccagtgtcttgccttg	<i>seh</i>	357	Rosec; Gigaud, 2002
SEH-1	tcacatcatatgcgaaagcag			
SEH-2	tagcaccaatcaccctttcc	<i>sei</i>	454	Omoe <i>et al.</i> , 2002
SEI-1	ggtgatattggtgtaggtaac			
SEI-2	atccatattctttgcctttaccag	<i>sej</i>	426	Rosec; Gigaud, 2002
SEJ-1	cagcgatagcaaaaatgaaaca			
SEJ-2	tctagcggaaacaacagttctga			

Fonte: Informações do autor.

7.5 Purificação e Seqüenciamento dos Fragmentos Amplificados pela PCR

Para confirmar a identidade dos fragmentos amplificados pela PCR, diferentes *amplicons* foram selecionados e purificados com o kit PureLink PCR Purification (Invitrogen, Brasil), seguindo as recomendações do fabricante. As reações de seqüenciamento foram realizadas com os mesmos *primers* usados para as amplificações de PCR, usando o “*Bigdye Kit*” (Applied Biosystems). As seqüências dos nucleotídeos obtidas no ABI-3100 (Applied Biosystems) foram analisadas pelos programas: agrupamento das seqüências de *S. aureus* - *forward* e *reverse* (HUANG; MADAN, 1999) e comparadas com seqüências depositadas no GenBank: versão 2.2.12 do programa Blast (ALTSCHUL *et al.*, 1990).

7.6 Pesquisa do Gene *coa* nos Isolados de *S. aureus* através da PCR

A região 3'-terminal do gene *coa* foi amplificada utilizando os seguintes *primers* específicos: *COAG2* (ACC ACA AGG TAC TGA ATC AAC G 3') e *COAG3* (5' TGC TTT CGA TTG TTC GAT GC 3') descritos por Aarestrup, Dangler e Sordillo (1995).

As reações de amplificação foram preparadas para um volume final de 25 µL, contendo: 20 ng do DNA genômico, tampão PCR 10x (10 mM Tris-HCl, pH 9,0; 50 mM de KCl), 1,5 mM de MgCl₂, 1 µM de cada *primer*, 2 mM de desoxinucleotídeos trifosfato (dNTP's) e 1 U de *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen, Brasil), completando-se com água deionizada estéril. Como controle positivo foi utilizada a cepa de *S. aureus* n° 25923 proveniente da *American Type Culture Collection* (ATCC 25923).

As amostras foram submetidas a 40 ciclos térmicos, cada um consistindo de 30 seg a 95°C, 2 min a 62°C e 4 min a 72°C (termociclador Biometra). Os *amplicons* foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corados com brometo de etídio (1,5 mg/mL), visualizados e fotografados em transiluminador de UV.

7.7 Extração do RNA Total

O protocolo para extração do RNA total foi padronizado levando em consideração algumas características dos *S. aureus* como a lise da parede celular de bactérias Gram-positivas. A obtenção do RNA bacteriano a partir de culturas de *S. aureus* foi realizada após crescimento a 24 horas para 19 isolados e a 48 horas para um, cujas medições da O.D. variaram de 1.2 a 1.6 em meio BHI (Brain Heart Infusion, Biobrás) e centrifugada a 14.000 rpm por 5min. O sedimento foi homogeneizado em 500 µL de tampão TE 10:1 com adição de 10 µL de lisozima (10 mg/mL) e 10 µL de lisostafina (2 mg/mL) homogeneizando-se 10 vezes. As amostras foram incubadas em banho-maria a 37°C por 40 min invertendo-se os tubos periodicamente durante o período de incubação. Após centrifugação a 14.000 rpm por 5 min, removeu-se o sobrenadante sendo adicionados posteriormente 500 µL de trizol (Invitrogen, Brasil), homogeneizando-se o conteúdo dos tubos com pipeta automática para lise da parede celular, e 100 µL de clorofórmio refrigerado por amostra incubando-se por 3 min a temperatura ambiente. Em seguida, foram acrescentados 250 µL de isopropanol por aproximadamente 300 µL do sobrenadante que foram transferidos para um outro tubo, após centrifugação a 14.000 rpm por 15 min. Para precipitação, a suspensão foi mantida a -80°C por 2 horas seguidas por centrifugação por 10 min. O sobrenadante, então, foi desprezado e os tubos invertidos em papel absorvente acrescentando-se posteriormente 200 µL de etanol a 75% para lavagem do sedimento de RNA. Após uma breve centrifugação por 2 min, removeu-se cuidadosamente todo o etanol e o precipitado foi ressuscitado em água tratada com DEPC e estocado a -80°C. A qualidade da preparação do RNA foi avaliada em gel de agarose a 1% e a quantificação e pureza do RNA total analisadas em espectrofotômetro (Ultrospec 2100 *pro*) a A_{260nm} (fator de diluição 1:500).

7.8 Análise da Expressão das Toxinas em *S. aureus*

A expressão das toxinas nos isolados de *S. aureus* portadores dos genes toxigênicos foi investigada através da Reação em Cadeia da Polimerase Transcriptase Reversa (RT-PCR). A obtenção do DNAc para a reação de PCR foi realizada a partir do RNA total dos isolados. Na mistura contendo o RNA total (100 ng/µL) tratado com DNase, foram adicionados 1 µL

(300 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) do random *primer* ou 20 pmol do *primer* gene específico, 10 mM dNTP's, 1 μL (200 U/ μL) da enzima Superscript III Reverse Transcriptase (Invitrogen, Brasil) ou 1 μL (200 U/ μL) da enzima MMLV Reverse Transcriptase (USB), 0,1 M de dTT e 1 μL da RNase out, sendo incubada por 5min a 25°C, 60 min por 50°C e 15 min por 70°C respectivamente.

Um controle negativo (apenas a mistura de reação, sem adicionar a enzima transcriptase reversa) foi incluído para cada amostra nas reações de RT-PCRs realizadas, além de dois controles positivos: a cepa padrão de *S. aureus* FRI 361 portadora dos genes *seg*, *sei* e *sej* e 20 isolados de *S. aureus* portadores do gene *coa*.

As reações de PCR foram realizadas para um volume final de 25 μL contendo: 10 pmol de cada *primer*, 1 U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen, Brasil), 160 μM de dNTP's, 1,5 mM de MgCl_2 , 10 mM do Tris-HCl, pH 9,0, 50 mM de KCl e 1,0-3,0 μL do DNAC. As amplificações foram realizadas em termociclador (Biometra) programado de acordo com o gene estudado como descrito anteriormente. Os produtos da PCR foram analisados em gel de agarose a 1%.

Foram utilizados *primers* direcionados aos genes responsáveis pela produção das enterotoxinas (A-E, G-J), da toxina-1 da síndrome do choque tóxico (TSST-1), das toxinas esfoliativas (ETA e ETB) e da coagulase como descritos previamente (Tabela 1).

8 RESULTADOS

De acordo com as características fenotípicas e bioquímicas, todos os 94 isolados obtidos neste estudo foram identificados como *S. aureus*, sendo 27 provenientes do município de São Bento do Una, nove isolados do município de Angelim, 13 isolados do município de Caetés, sete isolados do município de Correntes e 38 oriundos do município de Gravatá, todos os municípios localizados na região Agreste do estado de Pernambuco.

Destes isolados, 88 foram provenientes de amostras de leite em todos os municípios pesquisados e seis de amostras de queijo de coalho coletados e identificados apenas do município de Gravatá. Os *S. aureus* foram caracterizados com o objetivo de determinar a frequência e os tipos de genes toxigênicos, o gene da coagulase bem como seus perfis de resistência antimicrobiana.

Os perfis de resistência dos isolados toxigênicos e não toxigênicos aos 14 antibióticos puderam ser comparados (Tabela 2). A maioria dos isolados de *S. aureus* foi resistente à penicilina (88,3%), lincomicina (80,85%), amoxicilina (73,4%) e eritromicina (68,09%) mas foram susceptíveis a vancomicina (100%), sulfa + trimetoprim (93,62%), enrofloxacina (80,85%) e cloranfenicol (76,6%). Os isolados originados de São Bento do Una apresentaram o maior grau de resistência diante dos 14 antibióticos analisados. Dos 27 *S. aureus*, 18 foram resistentes a nove ou mais antibióticos simultaneamente. Dos 67 isolados pertencentes aos demais municípios, apenas 6,06% apresentaram este grau de multirresistência.

Tabela 2 - Percentual de resistência aos antibióticos de 94 *S. aureus* isolados de leite e queijo de coalho de cinco municípios da região Agreste de Pernambuco.

Município (nº de isolados)	% de resistência a														Média
	NOR	ENO	SUT	CLO	TET	ERI	PEN	AMO	NOV	OXA	VAN	BAC	LIN	GEN	
São Bento do Una (27)	22,22	14,81	3,704	48,15	51,85	96,15	85,19	74,07	66,67	85,19	0	92,59	100	100	60,04
Angelim (9)	0	37,5	12,5	25	12,5	83,33	87,5	62,5	37,5	50	0	100	100	87,5	49,70
Caetés (13)	7,69	0	0	0	7,69	7,69	84,62	84,62	0	0	0	30,77	61,54	7,69	20,88
Correntes (7)	0	0	0	0	14,29	14,29	71,43	71,43	0	0	0	0	0	28,57	14,29
Gravatá (38)	44,74	28,95	10,53	18,42	42,11	84,21	97,37	73,68	78,95	21,05	0	5,26	86,84	2,63	42,48
Total (94)	25,53	19,15	6,38	23,4	35,11	68,09	88,3	73,4	54,26	37,23	0	41,49	80,85	40,42	42,40

NOR = norfloxacina, ENO = enrofloxacina, SUT = sulfa + trimetoprim, CLO = cloranfenicol, TET = tetraciclina, ERI = eritromicina, PEN = penicilina G, AMO = amoxicilina, NOV = novobiocina, OXA = oxacilina, VAN = vancomicina, BAC = bacitracina, LIN = lincomicina e GEN = gentamicina.

Fonte: Informações do autor.

As análises para pesquisa dos genes responsáveis pela produção das enterotoxinas SEG, SEH, SEI e SEJ identificaram os segmentos de tamanho esperado em 88/94 (93,6%) dos *S. aureus* isolados de leite e queijo de coalho e 6/94 (6,4%) não amplificaram para nenhum dos genes toxigênicos.

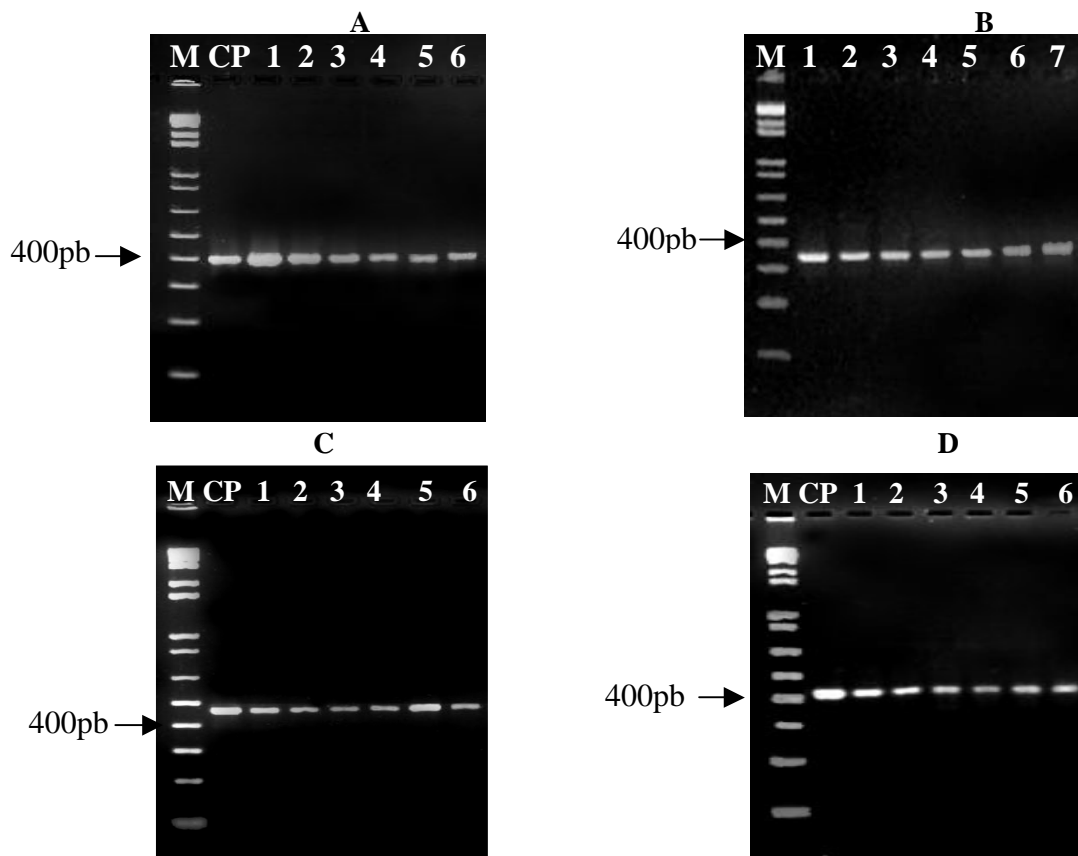
Entre os 88 isolados de *S. aureus* que amplificaram segmentos para a presença dos genes *seg*, *seh*, *sei* e *sej*, 31 (35,2%) amplificaram apenas para um gene, 33 (37,5%) amplificaram para dois genes, 17 (19,3%) amplificaram para três genes e sete (8%) amplificaram para os quatro genes permitindo classificar os segmentos de tamanho esperado dentro de 10 grupos genotípicos para a presença dos genes toxigênicos (Tabela 3). Além disso, 12 (13,6%) comportavam apenas o gene *seg*, 6 (6,8%) o gene *seh*, 13 (14,8%) o gene *sei*, 3 (3,4%) o genótipo *seg + seh*, 22 (25%) o genótipo *seg + sei*, 7 (8%) o genótipo *seg + sej*, 1 (1,1%) o genótipo *seh + sei*, 11 (12,5%) o genótipo *seg + seh + sei*, 6 (6,8%) o genótipo *seg + sei + sej* e 7 (8%) o genótipo *seg + seh + sei + sej*. Nenhum *S. aureus* isolado dos cinco municípios analisados apresentou a associação dos genes *seg + seh + sej* (Tabela 3).

No município de São Bento do Una foram encontrados os genótipos *seg* (4/27), *sei* (5/27), *seg + sei* (8/27), *seg + sej* (4/27), *seg + sei + sej* (1/27), no município de Angelim foi encontrado apenas o genótipo *sei* (8/9), no município de Caetés os genótipos *seg* (3/13), *seg + seh* (3/13), *seg + sei* (4/13), *seg + sej* (2/13), *seg + sei + sej* (1/13), no município de Correntes os genótipos *seh* (6/7), *seh + sei* (1/7) e no município de Gravatá foram encontrados os genótipos *seg* (5/38), *seg + sei* (10/38), *seg + sej* (1/38), *seg + seh + sei* (11/38), *seg + sei + sej* (4/38), *seg + seh + sei + sej* (7/38) (Tabela 3). Entre os seis *S. aureus* provenientes de amostra de queijo de coalho do município de Gravatá, foram encontradas as associações *seg + sei* (1/6), *seg + sej* (1/6), *seg + sei + sej* (2/6), *seg + seh + sei + sej* (2/6) (Figura 10A-D).

Tabela 3 - Distribuição dos genes *seg*, *seh*, *sei* e *sej* encontrados nos 94 *S. aureus* isolados de leite e queijo de coalho de cinco municípios da região Agreste do estado de Pernambuco.

Genes Toxigênicos (<i>seg-sej</i>)	Municípios				
	São Bento do Una	Angelim	Caetés	Correntes	Gravatá
<i>seg</i>	4	-	3	-	5
<i>seh</i>	-	-	-	6	-
<i>sei</i>	5	8	-	-	-
<i>seg + seh</i>	-	-	3	-	-
<i>seg + sei</i>	8	-	4	-	10
<i>seg + sej</i>	4	-	2	-	1
<i>seh + sei</i>	-	-	-	1	-
<i>seg + seh + sei</i>	-	-	-	-	11
<i>seg + sei + sej</i>	1	-	1	-	4
<i>seg + seh + sei + sej</i>	-	-	-	-	7
Isolados negativos	5	1	-	-	-
Total de <i>S. aureus</i>	27	9	13	7	38

Fonte: Informações do autor.

**Figura 10** - Produtos de amplificação representativos da PCR-Uniplex dos genes *seg*, *seh*, *sei* e *sej*.

Fonte: Informações do autor.

Nota: Linha M, marcador de peso molecular (100pb DNA ladder), linha CP- FRI 361. A (*seg*) linha 1- 1G, linha 2- 4G, linha 3- 19G, linha 4- 20G, linha 5- 21G, linha 6- 22G. B (*seh*): linha 1- CR6, linha 2- 1G, linha 3- 4G, linha 4- 19G, linha 5- 20G, linha 6- 21G, linha 7- 22G. C (*sei*): linha 1- 1G, linha 2- 4G, linha 3- 19G, linha 4- 20G, linha 5- 21G, linha 6- 22G. D (*sej*): linha 1- 1G, linha 2- 31G, linha 3- 40G, linha 4- 51G, linha 5- 53G, linha 6- 57G.

Nenhum dos 94 isolados de *S. aureus* examinados pela PCR-Multiplex comportava os genes *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *tst*, *eta* e *etb* havendo apenas a amplificação dos segmentos de tamanho esperado para os genes *sea*, *seb*, *sec*, *sed* e *tst* nas cepas de referência (FRI) usadas como controle positivo (Figura 11).

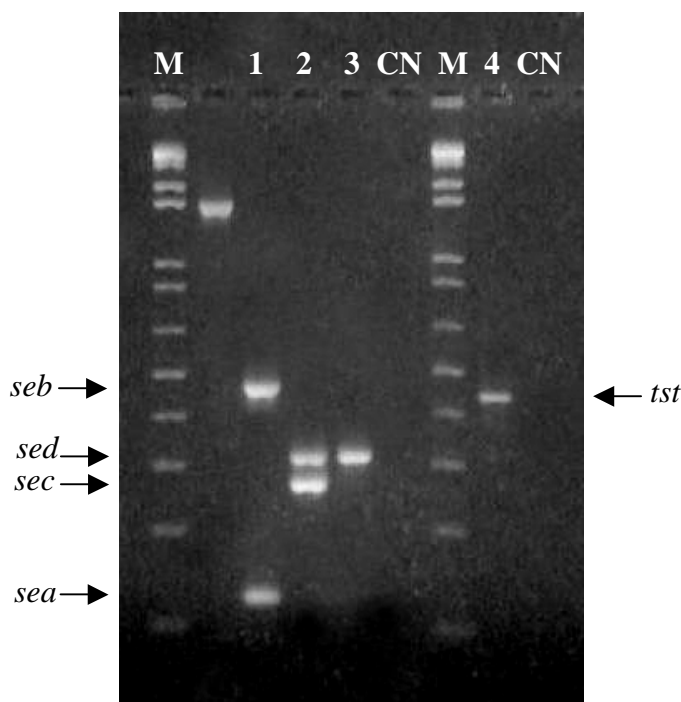


Figura 11 - Produtos de amplificação dos genes *sea*, *seb*, *sec*, *sed* e *tst* nas cepas padrão de *S. aureus* FRI através da PCR-Multiplex.

Fonte: Informações do autor.

Nota: Linha M, marcador de peso molecular (100pb DNA ladder), CN - controle negativo. Linha 1- FRI S6, linha 2- FRI 361, linha 3- FRI 1151, linha 4- FRI MN8.

Neste estudo foi observada com maior frequência a associação dos genes *seg* + *sei* (25%) nos isolados analisados, em seguida o gene *sei* isoladamente (14,7%) e o gene *seg* isoladamente (13,6%). A presença do gene *sei* foi significativa sendo detectado isoladamente no município de Angelim em 8/9 dos isolados de *S. aureus* e em todos os outros municípios isoladamente ou em associação com outros genes toxigênicos. No município de Gravatá o gene *seg* predominou, sendo detectado em (38/38) dos isolados analisados, embora em 5/38 o gene *seg* foi observado isoladamente, e em 33/38 dos isolados em associação com outros genes. Este município apresentou a maior variabilidade na distribuição dos genes toxigênicos entre os isolados de *S. aureus*.

O seqüenciamento confirmou que os isolados de *S. aureus* continham genes idênticos aos das enterotoxinas estafilocócicas (*seg*, *seh*, *sei* e *sej*) com elevado nível de similaridade. A

análise dos resultados com o programa Blast revelou alta homologia dos genes *seg*, *seh*, *sei* e *sej* nos isolados investigados quando comparados com seqüências depositadas no GenBank: 98%, 99%, 99% e 95%, respectivamente. Estes resultados confirmam a presença dos genes *seg*, *seh*, *sei* e *sej* nos isolados analisados.

Para genotipagem do gene *coa*, todos os 94 isolados de *S. aureus* provenientes dos cinco municípios investigados (São Bento do Una, Angelim, Caetés, Correntes e Gravatá) amplificaram dois fragmentos do gene permitindo distribuí-los em dois coagulotipos de acordo com o tamanho dos segmentos de amplificação: *coa1*= ~750 pb (62,8%, cinco *repeats* em *tandem*; n=5) e *coa2*= ~1000 pb (37,2%, oito *repeats* em *tandem*; n=8). A cepa padrão utilizada como controle positivo (*S. aureus* ATCC 25923) amplificou um fragmento de ~800 pb (Figura 12).

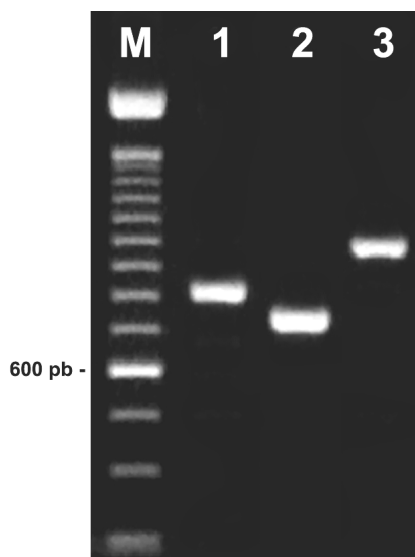


Figura 12 - Perfis eletroforéticos representativos da PCR do gene *coa* de *S. aureus* isolados em municípios da região Agreste de Pernambuco.

Fonte: Informações do autor.

Nota: Linha **M**, marcador de peso molecular (100pb DNA *ladder*), controle positivo: linha **1**- *S. aureus* ATCC 25923, linha **2**- Perfil *coa1*: ~750 pb, linha **3**- Perfil *coa2*: ~1000 pb.

Em São Bento do Una foram observados dois coagulotipos, com predominância do *coa2* (1000pb), presente em 80% dos isolados. Entretanto, dos nove isolados analisados no município de Angelim, 44,44% apresentaram o perfil *coa1* (750 pb) enquanto, que 55,56% dos isolados corresponderam ao perfil *coa2*. Dos 13 isolados de Caetés, 69,23% amplificaram o perfil *coa1* e 30,77% o perfil *coa2* e no município de Correntes, dos sete isolados, 57,14% apresentaram o coagulotipo *coa1* e 42,86% o *coa2*. Todos os 38 *S. aureus* isolados de leite e queijo de coalho do município de Gravatá apresentaram apenas um coagulotipo (*coa1*).

Todos os 88 isolados que pertenceram aos perfis genotípicos *coa1* e *coa2* portavam um ou mais genes toxigênicos. No entanto, dos seis isolados de *S. aureus* que não amplificaram para nenhum dos genes *seg*, *seh*, *sei* e *sej*, cinco apresentaram o coagulotipo *coa2* (1000 pb) e um isolado amplificou o perfil *coa1* (Tabela 4).

Os dois perfis genotípicos obtidos para o gene da coagulase dos 88 isolados foram classificados de acordo com os genes responsáveis pela produção das enterotoxinas SEG, SEH, SEI e SEJ, sendo distribuídos nos seguintes genótipos: *coa1* (*seg*), (*seh*), (*sei*), (*seg* + *seh*), (*seg* + *sei*), (*seg* + *sej*), (*seg* + *seh* + *sei*), (*seg* + *sei* + *sej*), (*seg* + *seh* + *sei* + *sej*) e *coa2* (*seg*), (*seh*), (*sei*), (*seg* + *seh*), (*seg* + *sei*), (*seg* + *sej*), (*seh* + *sei*) e (*seg* + *sei* + *sej*) (Tabela 4).

Tabela 4 - Perfis genotípicos dos isolados de *S. aureus*.

Coagulotipos	Nº de isolados	Genes Toxigênicos
coa1 (750 pb)	8	<i>seg</i>
	4	<i>seh</i>
	4	<i>sei</i>
	1	<i>seg</i> + <i>seh</i>
	14	<i>seg</i> + <i>sei</i>
	5	<i>seg</i> + <i>sej</i>
	-	<i>seh</i> + <i>sei</i>
	11	<i>seg</i> + <i>seh</i> + <i>sei</i>
	4	<i>seg</i> + <i>sei</i> + <i>sej</i>
	7	<i>seg</i> + <i>seh</i> + <i>sei</i> + <i>sej</i>
1	Negativos	
coa2 (1000 pb)	4	<i>seg</i>
	2	<i>seh</i>
	9	<i>sei</i>
	2	<i>seg</i> + <i>seh</i>
	8	<i>seg</i> + <i>sei</i>
	2	<i>seg</i> + <i>sej</i>
	1	<i>seh</i> + <i>sei</i>
	-	<i>seg</i> + <i>seh</i> + <i>sei</i>
	2	<i>seg</i> + <i>sei</i> + <i>sej</i>
	-	<i>seg</i> + <i>seh</i> + <i>sei</i> + <i>sej</i>
5	Negativos	

Fonte: Informações do autor.

Para análise da expressão dos genes toxigênicos, foram selecionados 20 isolados de *S. aureus* sendo um isolado representado pela cepa padrão de *S. aureus* FRI 361 e 19 isolados provenientes dos cinco municípios da região Agreste de Pernambuco, que portavam um ou mais genes toxigênicos investigados pela PCR Uniplex. Cada isolado foi examinado pela extração do RNA total e pela transcrição dos RNAs dos genes *seg*, *seh*, *sei* e *sej* através da RT-PCR.

Para a padronização da técnica da RT-PCR foi utilizada a cepa padrão de *S. aureus* FRI 361 (portadora dos genes *seg*, *sei* e *sej*) cujo RNA foi avaliado a concentrações de 10 ng/μL, 100 ng/μL e 1000 ng/μL. Após a realização das PCRs para os transcritos *seg* e *sej*, foi observada a mesma eficiência, no entanto para o transcrito *sei*, não houve amplificação do DNAc originado a partir de 10 ng/μL do RNA. Portanto, todas as reações de RT-PCR foram realizadas a partir de 100ng do RNA com os 20 isolados de *S. aureus* investigados (Figura 13).

Devido ao polimorfismo do gene da coagulase ser utilizado como marcador epidemiológico através de técnicas de caracterização de *S. aureus* e como controle adicional das reações de RT-PCR e da integridade dos DNAs, a expressão do gene *coa* também foi avaliada. A distribuição dos genes *seg*, *seh*, *sei* e *sej* entre os 20 isolados de *S. aureus* assim como os respectivos coagulotipos estão listados na tabela 5 e figura 14A-B.

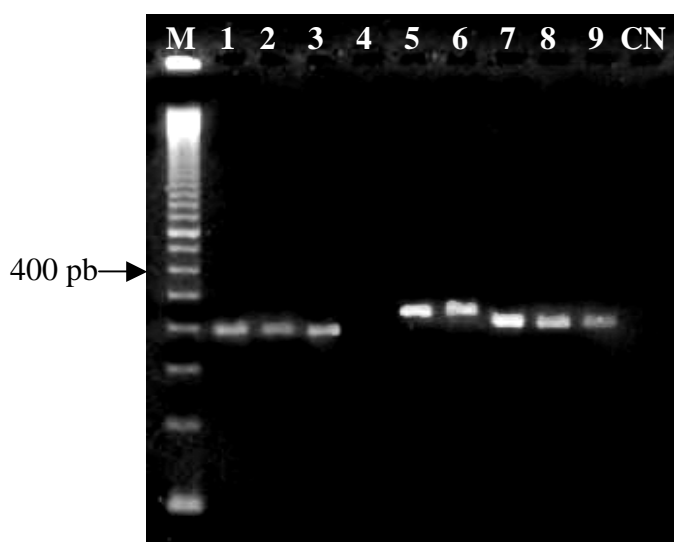


Figura 13 - Padronização da RT-PCR com concentrações variáveis do RNA total.

Fonte: Informações do autor.

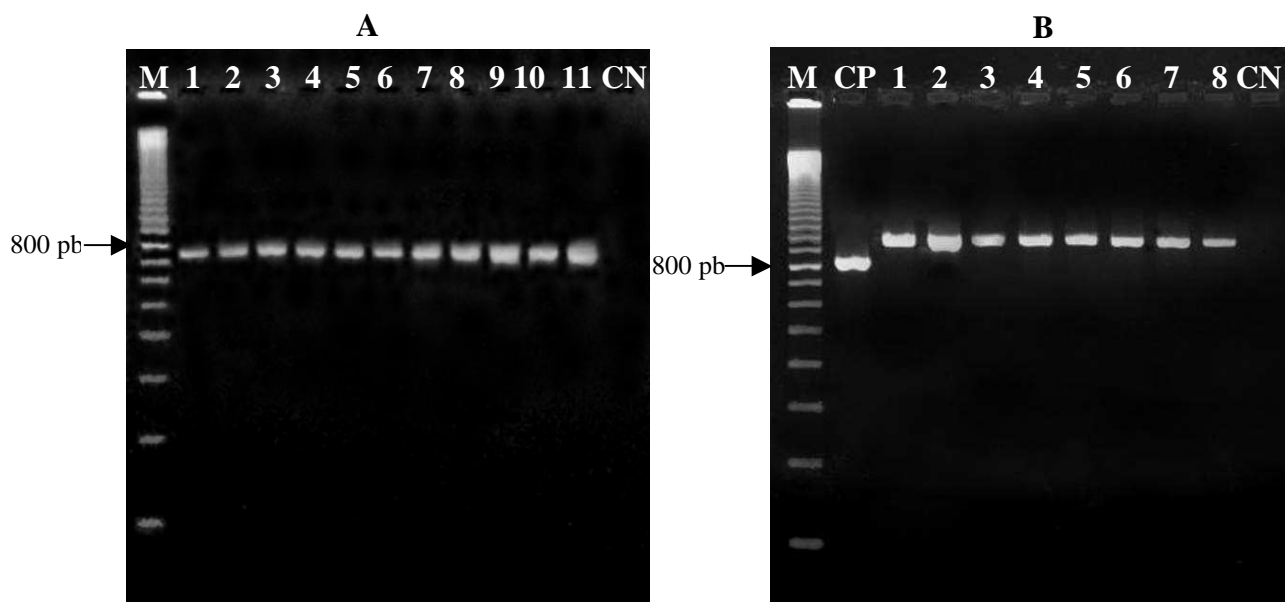
Nota: Linha **M**, marcador de peso molecular (100pb DNA ladder), **CN**- controle negativo. Linhas **1, 2** e **3** (*seg* - 10 ng/μL, 100 ng/μL e 1000 ng/μL), linhas **4, 5** e **6** (*sei* - 10 ng/μL, 100 ng/μL e 1000 ng/μL), linhas **7, 8** e **9** (*sej* - 10 ng/μL, 100 ng/μL e 1000 ng/μL).

Tabela 5 - Isolados de *S. aureus* selecionados por município e por genótipo para realização da RT-PCR.

Isolados de <i>S. aureus</i>	<i>ses</i>	Transcritos para as SEs	Transcritos <i>coa</i>
FRI 361	<i>seg + sei + sej</i>	<i>seg + sei + sej</i>	800 pb
10SB	<i>seg + sei + sej</i>	-	1000 pb
20SB	<i>seg</i>	<i>seg</i>	1000 pb
5A	<i>sei</i>	-	1000 pb
7A	<i>sei</i>	<i>sei</i>	1000 pb
34SB	<i>seg</i>	-	1000 pb
C	<i>seg + sej</i>	<i>seg + sej</i>	750 pb
F	<i>seg + sei</i>	<i>seg</i>	750 pb
I	<i>seg + sei</i>	<i>seg</i>	1000 pb
L	<i>seg + seh</i>	-	1000 pb
CR1	<i>seh + sei</i>	-	1000 pb
CR2	<i>seh</i>	<i>seh</i>	750 pb
CR6	<i>seh</i>	<i>seh</i>	750 pb
1G	<i>seg + seh + sei + sej</i>	<i>seg</i>	750 pb
19G	<i>seg + seh + sei</i>	<i>seh</i>	750 pb
51G	<i>seg + sej</i>	-	750 pb
53G	<i>seg + seh + sei + sej</i>	<i>seh</i>	750 pb
85G	<i>seg + seh</i>	<i>seg + seh</i>	750 pb
99G	<i>seg + seh + sei + sej</i>	-	750 pb
100G	<i>seg + sei + sej</i>	-	750 pb

SB: São Bento do Una; A: Angelim; C-L: Caetés; CR: Correntes; G: Gravata

Fonte: Informações do autor.

**Figura 14** - Amplificação por PCR dos transcritos *coa* nos 20 isolados de *S. aureus* investigados pela RT-PCR.

Fonte: Informações do autor.

Nota: Linha M, marcador de peso molecular (100pb DNA ladder), linha CP- FRI 361, CN- controle negativo. A (*coa1*): linha 1-F, linha 2- CR6, linha 3- 19G, linha 4- 53G, linha 5- 85G, linha 6- 99G, linha 7- 100G, linha 8- C, linha 9- 1G, linha 10- 51G, linha 11- CR2. B (*coa2*): linha 1- 5A, linha 2- 7A, linha 3- 10SB, linha 4- 20SB, linha 5- 34SB, linha 6- I, linha 7- L, linha 8- CR1.

A transcrição dos RNAs dos genes *seg*, *seh*, *sei* e *sej* foi detectada em 12/20 isolados de *S. aureus* (60%), dos quais 9/12 amplificaram para um transcrito, 2/12 amplificaram para dois transcritos e 1/12 amplificou para três transcritos (Tabela 5).

Dos 12 isolados positivos para os RNAs transcritos de *seg*, *seh*, *sei* e *sej*, 4/12 apresentaram apenas *seg* (20SB, F, I e 1G), 4/12 apresentaram *seh* (CR2, CR6, 19G, 53G), 1/12 apresentou *sei* (7A), 1/12 apresentou a associação *seg* + *seh* (85G), 1/12 apresentou a associação *seg* + *sej* (C) e 1/12 apresentou a associação *seg* + *sei* + *sej* (Tabela 5, Figura 15A-B). É importante ressaltar que esta última associação foi verificada apenas na cepa padrão FRI 361 usada como controle positivo.

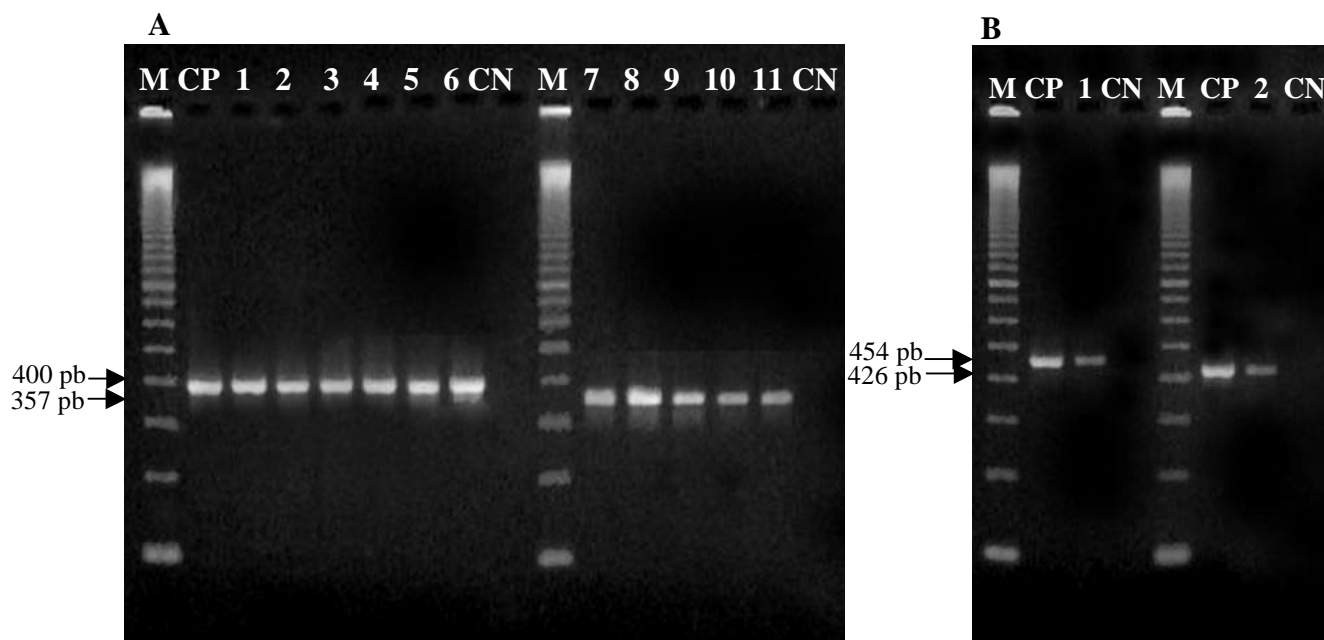


Figura 15 - Amplificação por PCR dos transcritos *seg*, *seh*, *sei* e *sej* nos 12 isolados de *S. aureus* investigados pela RT-PCR.

Fonte: Informações do autor.

Nota: Linha **M**, marcador de peso molecular (100pb DNA ladder), linha **CP**- FRI 361, **CN**- controle negativo. A (*seg* e *seh*): linha **1**-20SB, linha **2**- C, linha **3**- F, linha **4**- I, linha **5**- 1G, linha **6**- 85G, linha **7**- CR2, linha **8**- CR6, linha **9**- 19G, linha **10**- 53G, linha **11**- 85G. B (*sei* e *sej*): linha **1**- 7A, linha **2**- C.

9 DISCUSSÃO

Os resultados referentes ao teste de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* revelaram alta eficácia da vancomicina, possivelmente devido a sua reduzida utilização na medicina veterinária, pois em nenhum dos municípios estudados este antibiótico era utilizado. Além disso, foram verificados altos índices de resistência tanto para a amoxicilina quanto para a penicilina indicando que não devem ser usadas no tratamento da mastite estafilocócica nas propriedades dos municípios estudados. A amoxicilina pertence ao mesmo grupo de antibióticos beta-lactâmicos e geralmente os estafilococos mostram elevada resistência (acima de 70%) à penicilina G, bem como, ampicilina, amoxicilina e carbenicilina (TAVARES, 2000).

Diferenças na ocorrência de resistência à penicilina foram observadas entre vários países (AARESTRUP; JENSEN, 1998). Um estudo prévio realizado por Vintov *et al.* (2003) encontrou alta frequência de resistência à penicilina na Irlanda (71,4%), Inglaterra (67,3%), e nos Estados Unidos (50%), enquanto baixa frequência foi encontrada em países escandinavos, incluindo Dinamarca (18,7%), Noruega (2%), e Suécia (28,5%).

As variações encontradas nos índices de sensibilidade e resistência aos antibióticos foram observadas independentemente dos coagulotipos e da distribuição dos genes toxigênicos, mas puderam ocorrer devido a uma pressão seletiva exercida pelo uso de diferentes antibióticos em cada município. A alta resistência entre os isolados de *S. aureus* pode ser justificada pelo uso contínuo e indevido de antimicrobianos dentro dos municípios, o que fica evidente entre os isolados oriundos de São Bento do Una onde se pode observar 100% de resistência a gentamicina, antibiótico atualmente utilizado para o tratamento de mastites estafilocócicas no Brasil (LANGONI; MENDONÇA; DEVELLEY, 2000; FREITAS *et al.*, 2005).

Apesar de nenhum dos *S. aureus* isolados de leite e queijo de coalho ter amplificado os genes para as toxinas clássicas SEA, SEB, SEC, SED, SEE, TSST-1, ETA e ETB, a frequência de isolados comportando os genes que codificam as enterotoxinas SEG, SEH, SEI e SEJ foi muito alta (93,6%). Alguns autores relataram que 52,5% a 93,6% dos *S. aureus* isolados de leite portavam pelo menos um dos genes estudados para as enterotoxinas (BOEREMA; CLEMENS; BRIGHTWELL, 2006; KATSUDA *et al.*, 2005; STEPHAN; BUEHLER; LUTZ, 2002).

Estudos anteriores realizados em São Paulo e na Alemanha com isolados de *S. aureus* de origem bovina também não detectaram a presença destes genes ou detectaram em baixo percentual, apenas encontrando os genes para as enterotoxinas SEG-SEJ (CABRAL *et al.*, 2004; SALASIA *et al.*, 2004). Hayakawa *et al.* (1998) relataram que a produção de toxinas esfoliativas entre os *S. aureus* isolados de leite parece ser rara. O isolamento de *S. aureus* portadores destes genes na glândula mamária bovina pode indicar veiculação humana de infecção por este microrganismo (HAVERI *et al.*, 2007).

A ausência de genes para as toxinas clássicas e a presença dos genes para as demais toxinas descritas nos municípios estudados indica uma distribuição geográfica dos isolados toxigênicos. Os perfis dos genes para as SEs parecem ser variáveis entre diferentes anos e origens geográficas. Esta diferença pode resultar de adaptações do hospedeiro de *S. aureus* nas diferentes espécies animais (HWANG *et al.*, 2007).

Em vários locais são observados diferentes percentuais para os genes toxigênicos. Silva, Carmo e Silva (2005) relataram um baixo percentual de isolados contendo os genes *sea*, *seb* e *sec* de casos de mastite bovina no Estado de Minas Gerais. Omoe *et al.* (2002) ao analisarem 21 isolados de leite de vacas com mastite no Japão observaram que oito comportavam os genes *sec*, *seg* e *sei* e sete os genes *seg* e *sei* não sendo observada a presença dos genes para as toxinas clássicas.

Jorgensen *et al.* (2005b) ao analisarem *S. aureus* isolados de amostras de leite bovino e caprino em sete regiões da Noruega, constataram que na maioria das regiões era encontrado um único tipo de gene toxigênico e apenas uma das sete regiões apresentou grande diversidade de genes toxigênicos. Estes relatos fortalecem a teoria da existência de uma distribuição regional na prevalência de algumas SEs e seus genes, indicando uma dispersão dos isolados de *S. aureus* em áreas geográficas específicas. Diferentes autores relataram esta distribuição geográfica dos *S. aureus* enterotoxigênicos isolados de leite de vacas com mastite (FITZGERALD *et al.*, 1997; LARSEN *et al.*, 2000; STEPHAN *et al.*, 2001).

O papel das enterotoxinas SEG-SEJ na intoxicação alimentar estafilocócica parece ainda indeterminado (ROSEC; GIGAUD, 2002), no entanto, McLauchlin *et al.* (2000) ao analisarem 23 isolados de estafilococos envolvidos em casos de intoxicação alimentar não observaram a produção das enterotoxinas SEA, SEB, SEC, SED ou SEE, mas detectaram a presença dos genes toxigênicos *seg*, *seh*, *sei* e *sej*, indicando que estas SEs podem ser responsáveis por tais surtos de intoxicação alimentar.

Neste estudo a associação *seg* + *sei* foi detectada em 22/88 (25%) dos *S. aureus*, sendo esta associação a mais predominante. Rosec e Gigaud (2002) sugeriram que estas duas SEs

poderiam ser um importante elo filogenético entre as enterotoxinas estafilocócicas. No entanto, Jorgensen *et al.* (2005b) ao analisarem 101 isolados de tanques de leite bovino, verificaram baixa incidência da associação *seg* + *sei* (2/53).

Estes genes estão presentes em *S. aureus* orientados em *tandem* e separados por um fragmento de 1,9 kb localizados num operon denominado *enterotoxin gene cluster* (*egc*) presente no genoma do *S. aureus*. Embora fosse esperado detectar o gene *seg* apenas em associação com o gene *sei*, por estarem interligados (MCLAUHLIN *et al.* 2000, MUNSON *et al.* 1998; OMOE *et al.* 2002), neste estudo, alguns isolados comportavam o gene *seg* ou o gene *sei* isoladamente.

Na análise dos *S. aureus* investigados dos cinco municípios da região Agreste do estado de Pernambuco, os genes *sei* e *seg* de forma isolada representaram os segundo (14,8%) e terceiro (13,6%) genótipos dominantes, respectivamente. Abe *et al.* (2000) também apontam que SEG foi uma das mais freqüentes toxinas produzidas por *S. aureus*. Estes resultados sugerem que os genes *seg* e *sei* nem sempre coexistem no mesmo isolado e parece também existir uma distribuição geográfica destas associações.

Isolados de *S. aureus* de 10 amostras de produtos derivados de leite cru foram positivas para um ou mais genes (*seg-sej*) sem produção das enterotoxinas clássicas ou presença dos seus respectivos genes. Entre os 122 isolados que portavam os genes *seg-sej*, *seg* e *sei* foram predominantes (39,3% e 46,7%, respectivamente) e esta combinação foi encontrada em 34,4% destes isolados (LONCAREVIC *et al.*, 2005).

O gene *seh* foi detectado em 28/88 (31,8%) dos isolados de *S. aureus* isoladamente ou em associação com genes para outras enterotoxinas, sendo estes resultados divergentes dos descritos por outros autores, pois baixos percentuais (inferiores a 16%) ou a não detecção do gene *seh* foi relatada (CABRAL *et al.*, 2004; CREMONESI *et al.*, 2005; JORGENSEN *et al.*, 2005b; OMOE *et al.*, 2002; SALASIA *et al.*, 2004; ZSCHÖCK *et al.*, 2005). O percentual de 31,8% encontrado é considerado elevado em relação aos encontrados em outros locais, reforçando a evidência da distribuição geográfica entre os isolados toxigênicos de *S. aureus*. O gene *seh* foi observado nos municípios de Caetés, Correntes e Gravatá.

Em um massivo surto de intoxicação alimentar envolvendo 10000 casos causados pela ingestão de leite reconstituído que tinha como matéria prima leite desnatado em pó em Osaka, Japão, verificou-se que a toxina envolvida era a SEA, mas segundo Ikeda *et al.* (2005) a quantidade detectada (80 ng) seria insuficiente para causar um surto com tamanha extensão. Desta forma, estes autores se propuseram a investigar dez lotes do leite em pó desnatado envolvido em tal surto com relação à presença de outras toxinas além da SEA, utilizando a

técnica de PCR. Verificaram a presença dos genes *sea* e *seh* em 10 amostras, realizaram a quantificação da SEH por ELISA e concluíram que o referido surto foi causado por pequenas quantidades de SEA e SEH, pois estas toxinas estavam presentes na mesma quantidade em todas as amostras analisadas e que 30µg de SEH causa resposta emética em macacos após 1,5 a 3 horas da administração (SU; WONG, 1995).

A coexistência dos genes *sej* e *sed* foi relatada por muitos pesquisadores (BECKER *et al.*, 2003; MENDOZA; MARTIN, 2005; NASHEV *et al.*, 2004; ZHANG *et al.*, 1998). A caracterização adicional da enterotoxina D, um dos tipos mais comumente associados com intoxicação alimentar e codificada pelo plasmídeo pIB 485, revelou a presença de um quadro aberto de leitura que codifica a enterotoxina J (ZHANG *et al.*, 1998). Apesar da coexistência dos genes *sed* e *sej* no mesmo plasmídeo, no presente estudo, o gene *sej* foi obtido apenas em associação com *seg*, *seh* e *sei* (22,8%) não havendo correlação com o gene *sed* investigado pela PCR-Multiplex.

A pesquisa do gene *coa* pela PCR revelou a existência de um clone predominante (*coa1*) de *S. aureus* nos municípios da região Agreste (São Bento do Una, Angelim, Caetés, Correntes e Gravatá) sugerindo que este clone possui propriedades especiais para superar os mecanismos de defesa do hospedeiro e estabelecer a infecção nos rebanhos das propriedades leiteiras (VAUTOR *et al.*, 2003).

Todos os 88 isolados pertencentes aos coagulotipos de 750 pb e 1000 pb apresentaram os genes *seg*, *seh*, *sei* e *sej* isoladamente ou em associação, não havendo uma correlação clara entre os perfis do gene da coagulase e dos genes toxigênicos. O coagulotipo de 750 pb diferiu em duas associações (*seg + seh + sei* e *seg + seh + sei + sej*) e o coagulotipo de 1000 pb, em apenas uma associação (*seh + sei*).

Quando patógenos de múltiplos genótipos infectam um hospedeiro, competem pela fonte de nutrição e transmissão. Nesta condição, os genótipos com virulência aumentada são mais competitivos (NOWAK; MAY, 1994; SU *et al.*, 1999). A produção de toxinas superantigênicas por parte de alguns clones possibilita a inibição do sistema imune e sobrevivência da bactéria no hospedeiro (FERENS *et al.*, 1998).

Os 38 *S. aureus* oriundos do município de Gravatá isolados de leite e queijo de coalho apresentaram apenas um coagulotipo (*coa1*). O isolamento de *S. aureus* provenientes de queijo de coalho apresentando o mesmo coagulotipo daqueles identificados nas amostras de leite, evidencia a importância epidemiológica da veiculação destes microrganismos a partir do leite utilizado para a fabricação artesanal dos queijos e o risco potencial à saúde dos consumidores da região. Rosec *et al.* (1997), analisando queijos preparados com leite cru, observaram a

presença da enterotoxina SEC em 73,7% das 61 amostras analisadas responsáveis por casos de toxinfecção alimentar. Os isolados de *S. aureus* do município de Gravatá apresentaram maior variabilidade genética quanto à distribuição dos genes toxigênicos e apenas o coagulotipo de 750 pb, sendo importante destacar, a distância geográfica desse município em relação aos demais analisados neste estudo (Figura 8).

A RT-PCR tem sido usada para examinar a transcrição de RNAm em isolados de *S. aureus* portadores de *seg*, *seh* e *sei* (OMOE *et al.*, 2002). Neste estudo, a expressão dos genes *seg*, *seh*, *sei* e *sej* em *S. aureus* provenientes de leite e queijo de coalho foi investigada pela transcrição dos RNAs de 20 isolados representativos com base na presença destes genes. Os resultados demonstraram a expressão potencial dos genes *seg*, *seh*, *sei* e *sej* em 12/20 isolados de *S. aureus* com predominância dos transcritos *seg* e *seh* isoladamente e em associação (11/12). A expressão de um gene pode ser altamente dependente do próprio aparato genético de cada isolado e das condições de crescimento, o que poderia explicar os resultados negativos verificados nesta análise.

A seleção destes isolados foi baseada na distribuição dos genes responsáveis pela produção das enterotoxinas SEG, SEH, SEI e SEJ e no envolvimento das mesmas em surtos de intoxicação alimentar já relatados, uma vez que alguns casos de intoxicação alimentar (aproximadamente 5% de acordo com estimativas) nos quais nenhuma das enterotoxinas clássicas foi detectada, puderam ser atribuídos às demais enterotoxinas (ROSEC; GIGAUD, 2002; SU; WONG, 1995).

Apesar da transcrição dos RNAs ter sido realizada em uma amostragem pequena de isolados de *S. aureus*, a relevância da presença dos genes *seg*, *seh*, *sei* e *sej*, isoladamente e em associação, foi enfatizada pela possível produção de suas respectivas enterotoxinas. Um elemento importante na regulação da expressão de genes é a estabilidade variável de RNAs de acordo com o *locus* gênico e a taxa de crescimento das bactérias. Por isso, para garantir a integridade do RNA e do DNAc subsequente gerado após ensaios de RT-PCRs, a cepa padrão FRI 361 e a avaliação do transcrito *coa* foram inseridas na análise da transcrição reversa.

Omoie *et al.* (2002) demonstraram que a maior parte dos isolados de *S. aureus* portadores do gene *seh* foi capaz de produzir uma quantidade significativa de enterotoxina SEH. Entretanto, a maior parte dos isolados de *S. aureus* portadores de *seg* e aproximadamente 60% dos isolados portadores de *sei* não produziram um nível detectável de SEG e SEI quando o método de ELISA foi realizado, enquanto que a transcrição de RNAm de SEG e SEI nestes isolados tenha sido comprovada pela análise por RT-PCR.

A demonstração da produção de toxina em quantidades que sejam suficientes para causar doenças por isolados de *S. aureus* portadores destes genes ainda é necessária (OMOE *et al.*, 2005). Apenas a detecção dos genes toxigênicos em *S. aureus* não implica que estes isolados produzam SEs em um nível suficiente para causar quadros de intoxicação alimentar ou outras doenças associadas as enterotoxinas (CHIANG *et al.*, 2008) uma vez que a produção das SEs também é influenciada por fatores do ambiente (pH, atividade de água, atmosfera entre outros).

Portanto, é razoável sugerir que o risco de intoxicação alimentar por *S. aureus* pode ser efetivamente avaliado com base na expressão do RNAm correspondente. Assim, pode-se determinar que os *S. aureus* positivos pela PCR e RT-PCR examinados neste estudo expressaram os genes responsáveis pelas enterotoxinas apresentando potencial para causarem quadros de intoxicação alimentar entre outras doenças.

10 CONCLUSÕES

- a) Foi elevada a frequência no número de *S. aureus* presentes nas amostras de leite e queijo de coalho dos municípios da região Agreste de Pernambuco (São Bento do Una, Angelim, Caetés, Correntes e Gravatá) com destaque para os municípios de Gravatá e São Bento do Una;
- b) A alta frequência de isolados de *S. aureus* multirresistentes decorrente do uso indiscriminado de antibióticos, nos municípios analisados, compromete a qualidade do leite e de produtos derivados, além de dificultar o tratamento de doenças potencialmente curáveis;
- c) A ausência de genes responsáveis pelas toxinas clássicas e a presença de outros genes toxigênicos nos isolados de *S. aureus* da região Agreste de Pernambuco sugere uma distribuição geográfica dos genes toxigênicos;
- d) Apesar da ausência de *S. aureus* portadores dos genes *sea-see*, nos municípios estudados, a ampla distribuição de isolados portadores dos genes toxigênicos *seg*, *seh*, *sei* e *sej* representa um risco para a saúde do consumidor, principalmente no que se refere à expressão destes genes constatada em alguns isolados;
- e) A existência de um perfil genotípico predominante pela avaliação do gene *coa* sugere que poucos clones podem estar circulando entre os diferentes municípios da região Agreste de Pernambuco.
- f) Não houve correlação entre os coagulotipos e os genes toxigênicos, já que perfis toxigênicos semelhantes foram observados nos dois coagulotipos presentes em *S. aureus* isolados de leite e queijo de coalho.

REFERÊNCIAS

AARESTRUP, F. M. Association between the consumption of antimicrobial agents in animal husbandry and the occurrence of resistant bacteria among food animals. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v. 12, p. 279-285, 1999.

AARESTRUP, F. M.; DANGLER, C. A.; SORDILLO, L. M. Prevalence of coagulase gene polymorphism in *Staphylococcus aureus* isolates causing bovine mastitis. **Canadian Journal of Veterinary Research**, Ottawa, v. 59, p. 124-128, 1995.

AARESTRUP, F. M.; JENSEN, N. E. Development of penicillin resistance among *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Denmark and other countries. **Microbial Drug Resistance**, Larchmont, v. 4, p. 247-256, 1998.

ABE, J. *et al.* Characterization and distribution of a new enterotoxin-related superantigen produced by *Staphylococcus aureus*. **Microbiology and Immunology**, Tokyo, v. 44, p. 79-88, 2000.

ADESIYUN, A. A.; LENZ, W.; SCHAAL, K. P. Exfoliative toxin production by *Staphylococcus aureus* strains isolated from animals and humans beings in Nigeria. **Microbiologica**, Bologna, v. 14, p. 357-362, 1991.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. (Brasil). Resolução nº 12, de 2 de janeiro de 2001. Regulamento Técnico Sobre os Padrões Microbiológicos para Alimentos. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Brasília, DF, 2 jan. 2001. p. 1-54.

ALCARÃS, L. E. *et al.* Detección de *Staphylococcus aureus* spp. en manipuladores de alimentos. **La Alimentación Latinoamericana**, Buenos Aires, n. 219, p. 44-47, 1997.

ALTSCHUL S. F. *et al.* Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, London, v.215, p. 403-410, 1990.

AMARAL, L. A. *et al.* Qualidade da água em propriedades leiteiras como fator de risco à qualidade do leite e à saúde da glândula mamária. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 71, n. 4, p. 417-421, out./dez., 2004.

ARAÚJO, W. P. *Staphylococcus aureus* em leite cru. Produção de enterotoxina, caracterização da origem provável, humana ou bovina, a partir de cepas isoladas. 1984.

127p. Tese (Livre Docência) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, São Paulo, 1984.

ARBUTHNOTT, J. P.; COLEMAN, D. C.; AZEVEDO, J. S. Staphylococcal toxins in human disease. **Journal of Applied Bacteriology**, London, v. 19, p. 101-107, 1990.

ARVOLA, T. *et al.* Rectal bleeding in infancy: clinical, allergological, and microbiological examination. **Pediatrics**, Evanston, v. 117, n. 4, p. 760-768, 2006.

ASAO, T. *et al.* 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**, Cambridge, v. 130, p. 33-40, 2003.

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**, Amsterdam, v. 68, p. 105-113, 2001.

BAIRD-PARKER, A. C. The Staphylococci: an introduction. **Journal for Applied Bacteriology Symposium Supplement**, New York, p. 1S-8S, 1990.

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

BASTOS, M. S. R. *et al.* Inspeção em uma indústria produtora de queijo tipo coalho no estado do Ceará, visando à implantação das boas práticas de fabricação. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 57, p. 130-136, 2001.

BAYLES, K. W.; IANDOLO, J. J. Genetic and molecular analyses of the gene encoding staphylococcal enterotoxin D. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 171, p. 4799-4806, 1989.

BAUER, M.D. *et al.* Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, Baltimore, v. 45, n. 4, p. 493-496, 1966.

BECK, H. S.; WISE, W. S.; DODD, F. H. Cost benefit analysis of bovine mastitis in the UK. **Journal of Dairy Research**, London, v. 59, p. 449-460, 1992.

BECKER, K. *et al.* Prevalence of genes encoding pyrogenic toxin superantigens and exfoliative toxins among strains of *Staphylococcus aureus* isolated from blood and nasal specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 41, p. 1434-1439, 2003.

BECKER, K.; ROTH, R.; PETERS, G. Rapid and specific detection of toxigenic *Staphylococcus aureus*: use of two multiplex PCR enzyme immunoassays for amplification and hybridization of staphylococcal enterotoxin genes, exfoliative toxin genes, and toxic syndrome toxin 1 gene. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.36, p. 2548-2553, 1998.

BENITES, N. R. *et al.* Aetiology and histopathology of bovine mastitis of expontaneous ocurrente. **Journal of Veterinary Medicine**, Berlin, v. 49, p. 366-370, 2002.

BENNETT, R.W. Atypical Toxigenic *Staphylococcus* and Non-*Staphylococcus aureus* Species on the Horizon? An update. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.59, p. 1123-1126, 1996.

BERGDOLL, B. M. Analytical methods for *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 10, p. 91-100, 1990.

BERGDOLL, M. S. *Staphylococcus aureus*. In: _____. **Foodborne bacterial pathogens**. New York: Marcel Dekker, 1989. p. 463-523.

BETLEY; M. J.; MEKALANOS, J. J. Nucleotide sequence of type A staphylococcal enterotoxin gene. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 170, p. 34-41, 1988.

BHATIA, A.; ZAHOOR, S. *Staphylococcus aureus* Enterotoxins: A Review. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, Delhi, v. 1, n. 2, p. 188-197, 2007.

BLAIOTTA, G. *et al.* Biotyping of Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* by Enterotoxin Gene Cluster (*egc*) Polymorfism and *spa* Typing Analyses. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 72, n. 9, p. 6117-6123, 2006.

BOEREMA, J. A.; CLEMENS, R.; BRIGHTWELL, G. Evaluation of molecular methods to determine enterotoxigenic status and molecular genotype of bovine, ovine, human and food isolates of *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 107, p. 192-201, 2006.

BOHACH, G. A. *et al.* Staphylococcal and streptococcal pyrogenic toxins involved in toxic shock syndrome and related illnesses. **Critical Reviews in Microbiology**, Boca Raton, v. 17, n. 4, p. 251-272, 1990.

BOHACH, G. A.; SCHLIEVERT, P. M. Conservation of the Biologically Active Portions of Staphylococcal Enterotoxins C1 and C2. **Infection and Immunity**, Washington, v. 57, p. 2249-2252, 1989.

BOHACH, G. A.; SCHLIEVERT, P. M. Nucleotide sequence of the staphylococcal enterotoxin C1 gene and relatedness to other pyrogenic toxins. **Molecular and General Genetics**, Berlin, v. 209, p. 15-20, 1987.

BORGES, M. F. *et al.* Microrganismos patogênicos e indicadores em queijo de coalho produzido no estado do Ceará, Brasil. **Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v.21, n.1, p.31-40, 2003.

BOYLE-VAVRA, S. *et al.* A spectrum of changes occurs in peptidoglycan composition of glycopeptide-intermediate clinical *Staphylococcus aureus* isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 45, p. 280-287, 2001.

BRASCA, M. *et al.* The influence of different cultural conditions on the development and toxinogenesis of *Staphylococcus aureus*. **Scienza Tecnica Lattiero-Casearia**, Parma, v. 56, p. 105-115, 2005.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº146, de 7 de março de 1996. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Brasília, DF, 11 mar. 1996. p. 3977-3978.

BRYAN, F. L.; GUZEWICH, J. J; TODD, E. C. D. Surveillance of foodborne disease II. Summary and presentation of descriptive data and epidemiologic patterns; their value and limitations. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 60, p. 567-578, 1997.

BUTT, H. L. *et al.* An association of membrane-damaging toxins from coagulase-negative staphylococci and chronic orofacial muscle pain. **Journal of Medical Microbiology**, Edinburgh, v. 47, p. 577-584, 1998.

CABRAL, K. G. *et al.* Pheno and genotyping *Staphylococcus aureus*, isolated from bovine milk samples from São Paulo State, Brazil. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 50, p. 901-909, 2004.

CARDOSO, H. F. T. *et al.* Production of enterotoxin and toxic shock syndrome toxin by *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Brazil. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 29, p.347-349, 1999.

CARMO, L. S. *et al.* Staphylococcal food poisoning in Minas Gerais State, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 47, n. 2, p. 113-122, 1994.

CAVALCANTE, J. F. M. *et al.* Processamento do queijo coalho regional empregando leite pasteurizado e cultura láctica endógena. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 1, p. 205-214, jan.-mar. 2007.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin -- United States. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, v. 46, p. 765-766, 1997.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*-Pennsylvania. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, v. 51, p. 902, 2002.

CERQUEIRA, M. M. O. P. Surto epidêmico de toxinfecção alimentar envolvendo queijo tipo Minas Frescal em Pará de Minas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 46, n. 6, p. 723-728, 1994.

CERQUEIRA, M. M. O. P. *et al.* Frequência de *Listeria* spp. e de *Staphylococcus aureus* em queijo Minas produzido artesanalmente. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 299, n. 52, p. 17-20, 1997.

CHEN, T. R. *et al.* Development and use of PCR *primers* for the investigation of C1, C2 and C3 enterotoxin types of *Staphylococcus aureus* strains isolated from food-borne outbreaks. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 71, p. 63-70, 2001.

CHI, C-Y. *et al.* A Clinical and Microbiological Comparison of *Staphylococcus aureus* Toxic Shock and Scalded Skin Syndromes in Children. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 42, n. 2, p. 181-185, 2006.

CHIANG, Y-C. *et al.* PCR detection of Staphylococcal enterotoxins (SEs) N, O, P, Q, R, U, and survey of SE types in *Staphylococcus aureus* isolates from food-poisoning cases in Taiwan. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 121, p. 66-73, 2008.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. Wayne, 2002.

CLIVER, D. O. **Foodborne disease handbook: diseases caused by bacteria**. New York: Marcel Dekker, 1994. 613p.

CORBELLA, X. *et al.* *Staphylococcus aureus* nasal carriage as a marker for subsequent staphylococcal infections in intensive care unit patients. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, Berlin, v. 16, p. 351-357, 1997.

COSTA, E. O. *et al.* Escore de CMT em relação ao nível de células somáticas em leite do tanque de refrigeração e percentual de mastite subclínica em propriedades leiteiras de São Paulo e Minas Gerais. **Revista Nappama**, São Paulo, v. 3, n. 2, p. 14-18, 2000.

COUCH, J. L.; BETLEY, M. J. Nucleotide sequence of the type C3 staphylococcal enterotoxin gene suggests that intergenic recombination causes antigenic variation. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 171, p. 4507-4510, 1989.

COUCH, J. L.; SOLTIS, M.T.; BETLEY, M. J. Cloning and nucleotide sequence of type E staphylococcus enterotoxin. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 170, p. 2954-2960, 1988.

CREMONESI, P. *et al.* Development of a multiplex PCR assay for the identification of *Staphylococcus aureus* enterotoxigenic strains isolated from milk and dairy products. **Molecular and Cellular Probes**, London, v. 19 p. 299-305, 2005.

CRIBIER, B.; PIEMONT, Y.; GROSSHANS, E. Staphylococcal scalded skin syndrome in adults. **Journal of the American Academy of Dermatology**, St. Louis, v. 30, p. 319-324, 1994.

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

DINJUS, U. *et al.* Detection of the induction of *Salmonella* enterotoxin gene expression by contact with epithelial cells with RT-PCR. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 146, p. 75-179, 1997.

ENDO, Y. *et al.* Phage conversion of exfoliative toxin A in *Staphylococcus aureus* isolated from cows with mastitis. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 96, p. 81-90, 2003.

ERCOLINI, D. *et al.* PCR-based detection of enterotoxin *Staphylococcus aureus* in the early stages of raw milk cheese making. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 96, p. 1090-1096, 2004.

EVENSON, M. L. *et al.* Estimation of human dose of staphylococcal enterotoxin A from a large outbreak of staphylococcal food poisoning involving chocolate milk. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 7, p. 311-316, 1988.

FEITOSA, T. *et al.* Pesquisa de *Salmonella* sp., *Listeria* sp. e microrganismos indicadores higiênico-sanitários em queijos produzidos no Estado do Rio Grande do Norte. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, p. 162-165, 2003.

FERENS, W. A. *et al.* Activation of bovine lymphocyte subpopulations by staphylococcal enterotoxin C. **Infection and Immunity**, Washington, v. 66, p. 573-580, 1998.

FERREIRO, L.; SOUZA, H. M.; HEINECK, L. A. Influence of subclinical mastitis on the milk composition of the cross-bred dairy cattle. **Revista do Instituto de Laticínios Candido Tostes**, Juiz de Fora, v. 35, p. 19-24, 1980.

FITZGERALD, J. R. *et al.* Fine structure molecular epidemiological analysis of *Staphylococcus aureus* recovered from cows. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v. 119, p. 261-269, 1997.

FLOCK, J. I. *et al.* Reconsideration of the role of fibronectin binding in endocarditis caused by *Staphylococcus aureus*. **Infection and Immunity**, Washington, v. 64, p. 1876-1878, 1990.

FLORENTINO, E. R.; MARTINS, R. S. Características microbiológicas do “queijo de coalho” produzido no estado da Paraíba. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 13, n. 59, p. 43-48, jan./fev. 1999.

FOOD AND DRUG ASSOCIATION. **Antimicrobial resistance**: a growing threat. Disponível em: <http://www.fda.gov/oc/opacom/hottopics/anti_resist.html>. Acesso em: 17 set. 2002.

FORSYTHE, S. J. **The microbiology of safe food**. London: Blackwell Science, 2000. p. 155-201.

FRANCO, B. D. G. M; LANDGRAFF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 1996.

FRANCO, B. D. G. M; LANDGRAFF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2000.

FRAZIER, W. C.; WESTHOFF, D. C. **Microbiologia de los Alimentos**. 4. ed. Zaragoza: Acribia, 2000. 681 p.

FREITAS, M. F. L. **Caracterização fenotípica e genotípica de *Staphylococcus* spp. isolados de queijos de coalho e leite de vacas com mastite no estado de Pernambuco, Brasil**. 2006. 200p. Tese (Doutorado) - Departamento de Nutrição, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2006.

FREITAS, M. F. L. *et al.* Exotoxinas Estafilocócicas. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, Recife, v. 7, p. 63-74, 2004.

FREITAS, M. F. L. *et al.* Perfil de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* de *Staphylococcus* coagulase positivos isolados de leite de vacas com mastite no agreste do estado de Pernambuco. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 72, n. 2, p. 171-177, 2005.

FUEYO, J. M. *et al.* Enterotoxin production and DNA fingerprinting in *Staphylococcus aureus* isolated from human and food samples. Relations between genetic types and enterotoxins. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 67, p. 139-145, 2001.

FUEYO, J. M. *et al.* Relationships between toxin gene content and genetic background in nasal carried isolates of *Staphylococcus aureus* from Asturias, Spain. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 243, p. 447-454, 2005.

GARCIA, C. A. *et al.* Influência do ozônio sobre a microbiota do leite “in natura”. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 14, n. 70, p. 36-50, 2000.

GILBERT, P.; MCBAIN, A. J.; RICHARD, A. H. Formation of microbial biofilm in hygienic situations: a problem of control. **International Biodeterioration and Biodegradation**, Barking, v. 51, p. 245-248, 2003.

GILL, S. R. *et al.* Insights on Evolution of Virulence and Resistance from the Complete Genome Analysis of an Early Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strain and a Biofilm-Producing Methicillin-Resistant *Staphylococcus epidermidis* Strain. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 187, n. 7, p. 2426-2438, 2005.

GOH, S-H. *et al.* Molecular typing of *Staphylococcus aureus* on the basis of coagulase gene polymorfisms. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 30, p. 1642-1645, 1992.

HAVERI, M. *et al.* Virulence genes of bovine *Staphylococcus aureus* from persistent and nonpersistent intramammary infections with different clinical characteristics. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 103, p. 993-1000, 2007.

HAYAKAWA, Y. *et al.* Production of Exfoliative Toxin A by *Staphylococcus aureus* Isolated from Mastitic Cow's Milk and Farm Bulk Milk. **Journal of Veterinary Medicine Science**, Tokyo, v. 60, n. 11, p. 1281-1283, 1998.

HERZER, C. M. Toxic Shock Syndrome: Broadening the Differential Diagnosis. **The Journal of the American Board of Family Practice**, Waltham, v. 14, p. 131-136, 2001.

HIRAMATSU, K. *et al.* The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 9, p. 486-493, 2001.

HIROOKA, E. Y. *et al.* Enterotoxigenicity of *Staphylococcus intermedius* of canine origin. **International Journal Food Microbiology**, Amsterdam, v. 7, p. 185-191, 1988.

HOLECKOVÁ, B. *et al.* Ocurrence of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in food. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, Lublin, n. 9, p. 179-182, 2002.

HOLT, J. G. *et al.* **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. 9. ed. Baltimore: Williams e Wilkins, 1994. 787 p.

HOOKEY, J.; RICHARDSON, J. F.; COOKSON, B. D. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* based on PCR restriction length polymorphism and DNA sequence analysis of the coagulase gene. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 36, p. 1083-1089, 1998.

HUANG, I.Y. *et al.* Complete amino acid sequence of staphylococcal enterotoxin A. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 262, p. 7006-7013, 1987.

HUANG, X.; MADAN, A. 1999. CAP3: a DNA sequence assembly program. **Genome Research**, New York, v. 9, p. 868-877, 1999.

HWANG, S. Y. *et al.* Novel multiplex PCR for the detection of the *Staphylococcus aureus* superantigen and its application to raw meat isolates in Korea. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 117, p. 99-105, 2007.

IANOLO, J. J. Genetic analysis of extracellular toxins of *Staphylococcus aureus*. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 43, p. 375-402, 1989.

IANOLO, J. J. The genetics of staphylococcal toxins and virulence factors. In: GUNSALUS, I. C. (Ed.). **The bacteria**. New York: Academic Press, 1990. v. 11, p.399-426.

IBGE. **Sistema IBGE de recuperação automática**. Rio de Janeiro, 2004. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br>>. Acesso em: 12 dez. 2004.

IKEDA, T. *et al.* Mass outbreak of food poisoning disease caused by small amounts of staphylococcal enterotoxins A and H. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 252, p. 267-272, 2005.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. **APPCC na Qualidade e Segurança Microbiológica de Alimentos**. São Paulo: Varela 1997. 377p.

ITO, Y. *et al.* Staphylococcal scalded skin syndrome in an adult due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Infection and Chemotherapy**, Tokyo, v. 8, p. 256-261, 2002.

JAURRAD, S. *et al.* Involvement of enterotoxins G and I in staphylococcal toxic shock syndrome and staphylococcal scarlet fever. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 37, p. 2446-2449, 1999.

JAURRAD, S. *et al.* *egc* a highly prevalent operon of enterotoxin gene, forms a putative nurse of superantigens in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 166, p. 669-677, 2001.

JAY, J. M. **Microbiologia Moderna de los Alimentos**. Zaragoza: Acribia, 1994. 804 p.

JL, G.; BEAVIS, R. C.; NOVICK, R. P. Cell density control of staphylococcal virulence mediated by an octapeptide pheromone. **National Academy of Sciences USA**, Washington, v. 92, p. 12055-12059, 1995.

JOHNS JR, M. B.; KHAN, A. Staphylococcal enterotoxin B gene is associated with discrete genetic element. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 170, p. 4033-4039, 1988.

JOHNSON, H. M.; RUSSELL, J. K.; PONTZER, C. H. Staphylococcal enterotoxin microbial superantigens. **FASEB Journal**, Bethesda, v. 5, p. 2706-2712, 1991.

JONES, C. L.; KHAN, S. A. Nucleotide sequence of the enterotoxin B gene from *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 166, p. 29-33, 1986.

JORGENSEN, H. J. *et al.* An outbreak of staphylococcal food poisoning caused by enterotoxin H in mashed potato made with raw milk. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 252, p. 267-272, 2005a.

JORGENSEN, H. J.; MORK, T.; RORVIK, L. M. The occurrence of *Staphylococcus aureus* on farm with small-scale production of raw milk cheese. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 88, p. 3810-3817, 2005b.

JUDICIAL COMMISSION. Conservation of the generic name *Staphylococcus* Rosembach, designation of *Staphylococcus aureus* Rosembach and designation of a neotype culture of *Staphylococcus aureus* Rosembach. Opinion 17. **International Bulletin of Bacteriological Nomenclature and Taxonomy**, Ames, v. 8, p. 153-154, 1958.

KAIDA, S. *et al.* Nucleotide and deduced amino acid sequence of staphylocoagulase gene from *Staphylococcus aureus* strain 213. **Nucleic Acids Research**, London, v. 17, p. 8871, 1989.

KATSUDA, K. *et al.* Molecular typing of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitic milk on the basis of toxin genes and coagulase gene polymorphisms. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 105, p. 301-305, 2005.

KENDALL, L. V.; RILEY, L. K. Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR). **American Association for Laboratory Animal Science**, Memphis, v. 39, p. 42, 2000.

KÉROUANTON, A. *et al.* Characterization of *Staphylococcus aureus* strains associated with food poisoning outbreaks in France. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, p. 1-7, 2007.

KIM, C. H. *et al.* Optimization of the PCR for detection of *Staphylococcus aureus nuc* gene in bovine milk. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 84, p. 74-83, 2001.

KOKAN, N. P; BERGDOLL, M. S. Detection of low-enterotoxin-producing *Staphylococcus aureus* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 53, p. 2675-2676, 1987.

KONDO, I. *et al.* Two serotypes of exfoliatin and their distribution in staphylococcal strains isolated from patients with scalded skin syndrome. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 1, p. 397-400, 1975.

KONEMAN, F. W. *et al.* Cocos Gram-Positivos: Parte I: Estafilococos e Microrganismos Relacionados. **Diagnóstico Microbiológico: Texto e Atlas Colorido**. Rio de Janeiro: Medsi, 2001. 1465 p., p. 551-588.

KOROLKOVAS, A.; BUCKHALTER, J. H. **Química Farmacêutica**. Rio de Janeiro: Guanabara Dois, 1982.

KURODA, M. *et al.* Whole genome sequencing of methicilin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Lancet**, London, v. 357, p. 1225-1240, 2001.

LADHANI, S. Recent developments in staphylococcal scalded skin syndrome. **Clinical Microbiology and Infection**, Oxford, v. 7, p. 301-307, 2001.

LADHANI, S. Understanding the mechanism of action of the exfoliative toxins of *Staphylococcus aureus*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, Amsterdam, v. 39, p. 181-189, 2003.

LADHANI, S. *et al.* Clinical, microbial, and biochemical aspects of the exfoliative toxins causing staphylococcal scalded-skin syndrome. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v.12, p. 224-242, 1999.

LADHANI, S. *et al.* Development and evaluation of detection system for staphylococcal exfoliative toxin A responsible for scalded-skin syndrome. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 39, n. 6, p. 2050-2054, 2001.

LANGE, C. C.; BRITO, J. R. F. Influência da qualidade do leite na manufatura e vida de prateleira dos produtos lácteos: papel das altas contagens microbianas. In: BRITO, J. R. F.; PORTUGAL, J. A. (Ed.) **Diagnóstico da Qualidade do Leite, Impacto para a Indústria e a Questão dos Resíduos de Antibióticos**. Brasília, DF: Embrapa, 2003. p. 117-138.

LANGONI, H.; MENDONÇA, A. O.; DEVELLEY, A. Avaliação do uso da associação da bromexina com gentamicina no tratamento da mastite subclínica bovina. **Revista Napgama**, São Paulo, n. 1, p. 4-7, 2000.

LARSEN, H. D. *et al.* Differences between Danish bovine and human *Staphylococcus aureus* isolates in possession of superantigens. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 76, p. 153-162, 2000.

LAWRENCE, J. R. *et al.* Optical sectioning of microbial biofilms. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 173, p. 6558-6567, 1991.

LE LOIR, Y.; BARON, F.; GAUTIER, M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 2, n. 1, p. 63-76, 2003.

LEE, C. Y. *et al.* Sequence determination and comparison of exfoliative toxin A and B genes from *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 169, p. 3901-3909, 1987.

LEITE, C. C. *et al.* Qualidade bacteriológica do leite integral (tipo C) comercializado em Salvador – Bahia. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador, v. 3, n. 1, p. 21-25, 2002.

LEITE JÚNIOR, A. F. S. *et al.* Qualidade microbiológica do queijo de coalho comercializado à temperatura ambiente ou sob refrigeração, em Campina Grande-PB. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.14, n.74, p. 53-59, 2000.

LETERTRE, C. *et al.* Identification of a new putative enterotoxin SEU encoded by the *egc* cluster of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 95, p. 38-43, 2003.

LINDSAY, J. A. *et al.* The gene for toxic shock toxin is carried by a family of mobile pathogenicity islands in *Staphylococcus aureus*. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 29, p. 527-543, 1998.

LISA, R. W.; PLANO, M. D. *Staphylococcus aureus* exfoliative toxins: How they cause disease. **Journal of Investigative Dermatology**, Baltimore, v. 122, p. 1070-1077, 2004.

LONCAREVIC, S., JORGENSEN, H. J., LOVSETH, A. Diversity of *Staphylococcus aureus* enterotoxin types within single samples of raw milk and raw milk products. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 98, p. 344-350, 2005.

LONCAREVIC, S.; MATHISEN, T. Characterization of *Staphylococcus aureus* enterotoxin type H from a food outbreak. In: WORLD CONGRESS FOODBORNE INFECTIONS AND INTOXICATIONS, 5., 2004. Berlin. **Proceedings...** Berlin: Federal Institute for Risk Assessment, 2004. p. 118.

LOWY, F. *Staphylococcus aureus* infections. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 339, p. 520-532, 1998.

MAC FADDIN, J. F. **Biochemical test for identification of medical bacteria**. 2. ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1980. p. 527.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Biology of microorganisms**. 8. ed. London: Prentice Hall International, 1997.

MARR, J. C. *et al.* Characterization of novel type C staphylococcal enterotoxins: biological and evolutionary implications. **Infection and Immunity**, Washington, v. 61, p. 4254-4262, 1993.

MARRACK, P.; KAPPLER, J. The staphylococcal enterotoxins and their relatives. **Science**, Washington, v. 248, p. 705-711, 1990.

MARSHALL, K. C. Biofilms: an overview of bacterial adhesion, activity and control at surfaces. **American Society of Microbiology**, Washington, v. 58, p. 202-207, 1992.

MARTIN, M. C. *et al.* Genetic procedures for identification of enterotoxigenic strains of *Staphylococcus aureus* from three food poisoning outbreaks. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 94, p. 279-286, 2004.

MARTINEZ, M. B.; TADDEI, C. R. Métodos de Diagnóstico. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. (Ed.). **Microbiologia**. 4ed. São Paulo: Atheneu, 2004. p. 117-125.

MARTINEZ, T. C. N. *et al.* Caracterização de *Staphylococcus* sp. isolados de processos infecciosos de caninos utilizando plasmas de diferentes espécies animais. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador, v. 1, n. 2, p. 48-53, 2001.

MCCORMICK, J. K. *et al.* Functional analysis of the TCR binding domain of toxic shock syndrome toxin-1 predicts further diversity in MHC class II/superantigen/TCR ternary complexes. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 171, p. 1385-1392, 2003.

- MCDEVITT, D.; VAUDAUX, P.; FOSTER, T. J. Genetic evidence that bound coagulase of *Staphylococcus aureus* is not clumping factor. **Infection and Immunity**, Washington, v. 60, p. 1514-1523, 1992.
- MCDONALD, C.L.; CHAPIN, K. Rapid identification of *Staphylococcus aureus* from blood culture bottles by a classic 2-hour tube coagulase test. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 33, p. 50-52, 1995.
- MCLAUHLIN, J. *et al.* The detection of enterotoxins and toxic shock syndrome toxin genes in *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 63, p. 479-488, 2000.
- MEAD, P. S. *et al.* Food-related illness and death in the United States. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 5, p. 607-625, 1999.
- MEHROTRA, M.; WANG, G.; JOHNSON, W. M. Multiplex PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic methicillin resistance. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 38, p. 1032-1035, 2000.
- MELISH, M. E. Staphylococcal scalded skin syndrome: the expanded clinical syndrome. **Journal of Pediatrics**, St. Louis, v. 78, p. 958-967, 1971.
- MENDOZA, F. J. M.; MARTIN, M. C. Enterotoxins and toxic shock syndrome toxin in *Staphylococcus aureus* recovered from human nasal carriers and manually handled foods: Epidemiology and genetic findings. **Microbes and Infection**, Paris, v. 7, p. 187-194, 2005.
- MONDAY, S. R.; BOHACH, G. A. Use of multiplex PCR to detect classical and newly described pyrogenic toxin genes in staphylococcal isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 37, p. 3411-3414, 1999.
- MORAIS, C. M. **Processamento artesanal do queijo de coalho de Pernambuco, uma análise de perigos**. 1995. 91f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 1995.
- MOSSEL, D. A. A.; GARCIA, M. B. **Microbiología de Los Alimentos**: Fundamentos ecológicos para garantizar y comprobar la inocuidad y la calidad de los alimentos. 1. ed. Zaragoza: Acribia, 1985. 375 p.

MUNSON, S. H. *et al.* Identification and characterization of Staphylococcus enterotoxin type G and I from *Staphylococcus aureus*. **Infection and Immunity**, Washington, v. 66, p. 3337-3348, 1998.

MURRAY, P. R. *et al.* **Microbiologia Médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992.

NASHEV, D. *et al.* Distribution of virulence genes of *Staphylococcus aureus* isolated from stable nasal carriers. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 233, p. 45-52, 2004.

NASSU, R. T. *et al.* Diagnóstico das condições de processamento e qualidade microbiológica de produtos regionais derivados do leite produzido no Estado do Rio Grande do Norte. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 55, n. 315, p. 21-126, 2000.

NASSU, T. R. *et al.* Diagnóstico das condições de processamento e caracterização físico-química de queijos regionais e manteiga no Rio Grande do Norte. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento (on line)**, Fortaleza, n. 11, 2003. Disponível em <www.cnpat.embrapa.br/publica/pub/BolPesq/bd_11.pdf>. Acesso em: 30 nov. 2005.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **TaxBrowser**, Washington, 12 dez. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=taxonomy>>. Acesso em: 12 dez. 2006.

NAWAZ, M. S. *et al.* **Human Health Impact and Regulatory Issues Involving Antimicrobial Resistance in The Food Animal Production Environment**. Disponível em: <<http://www.fda.gov/nctr/science/journals/text/vol1iss1/rrp0701.htm>>. Acesso em: 17 set. 2002.

NEMA, V. *et al.* Isolation and characterization of heat resistant enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* from a food poisoning outbreak in Indian subcontinent. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 117, p. 29-35, 2007.

NOBLE, W. C. Skin bacteriology and the role of *Staphylococcus aureus*. **British Journal of Dermatology**, London, v. 53, p. 9-12, 1998.

NOUT, M. J. R. Fermented foods and food safety. **Food Research International**, Essex, v. 27, n. 7, p. 291-298, 1994.

NOVAK, F. R. **Ocorrência de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina em leite humano ordenhado**. 1999. 102p. Tese (Doutorado) - Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1999.

NOVICK, R. P. Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 48, p. 1429-1449, 2003.

NOWAK, M.; MAY, R. Superinfection and the evolution of parasite virulence. **Proceedings of the Royal Society of London**, London, v. 255, p. 81-89, 1994.

OLIVEIRA, A. A. F.; MOTA, R. A.; SOUZA, M. I. Perfil de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* frente à amostra de *Staphylococcus* spp. isoladas de mastite subclínica bovina, no agreste meridional de Pernambuco. **A Hora Veterinária**, Porto Alegre, v. 22, n. 127, p. 8-10, 2002.

OMOE, K. *et al.* Comprehensive analysis of classical and newly described staphylococcal superantigenic toxin genes in *Staphylococcus aureus* isolates. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 246, p. 191-198, 2005.

OMOE, K. *et al.* Identification and characterization of a new staphylococcal enterotoxin-related putative toxin encoded by two kinds of plasmids. **Infection and Immunity**, Washington, v. 71, p. 6088-6094, 2003.

OMOE, K. *et al.* 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**, Washington, v. 40, n. 3, p. 857-862, 2002.

ORWIN, P. M. *et al.* Biochemical and biological properties of staphylococcal enterotoxin K. **Infection and Immunity**, Washington, v. 69, p. 360-366, 2001.

PAIVA, M. S. D.; CARDONHA, A. M. S. Queijo de coalho artesanal e industrializado produzidos no Rio Grande do Norte: estudo comparativo da qualidade microbiológica. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 13, n. 61, p. 33, 1999.

PALMQVIST, N. *et al.* Protein A is a virulence factor in *Staphylococcus aureus* arthritis and septic death. **Microbial Pathogenesis**, London, v. 33, p. 239-249, 2002.

PAULSEN, I. T.; FIRTH, M.; SKURRAY, R. A. Resistance to antimicrobial agents other than β -lactams. In: CROSSLEY, K. B.; ARCHER, G. L. (Ed.). **The Staphylococci in Human Disease**. New York: Churchill Livingstone, 1997. p. 175-212.

PEREIRA, M. L. *et al.* Enterotoxin H in staphylococcal food poisoning. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 59, p. 559-561, 1996.

PEREIRA, M. L. *et al.* Staphylococcal food poisoning by cheese 'tipo Minas'. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 22, p. 349-350, 1991.

PERESI, J. T. M. *et al.* Queijo minas tipo frescal artesanal e industrial: qualidade microscópica, microbiológica e teste de sensibilidade aos agentes antimicrobianos. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 15, p. 63-70, 2001.

PERNAMBUCO. Governo. Mapa de Pernambuco. Recife, 2004. Disponível em: <<http://www2.pe.gov.br/web/portalpe/mapas>>. Acesso em: 15 set. 2004.

PHONIMDAENG, P. *et al.* The coagulase of *Staphylococcus aureus* 8325-4: sequence analysis and virulence of site-specific coagulase-deficient mutants. **Molecular Microbiology**, v. 4, p. 393-404, 1990.

PORTUGAL, J. A. B; BRITO, M. A. V. P; CASTRO, M. C. D. A. A qualidade do leite e os resíduos de antibióticos. **Revista do Instituto de Laticínios Candido Tostes**, Juiz de Fora, v. 56, p. 3-8, 2001.

PRATTEN, J. *et al.* *Staphylococcus aureus* accessory regulators: expression within biofilms and effect on adhesion. **Microbes and Infection**, Paris, v. 3, p. 633-637, 2001.

PROJAN, S.; NOVICK, R. The molecular basis of pathogenicity. In: CROSSLEY, K. B.; ARCHER, G. L. (Ed.). **The Staphylococci in Human Disease**. New York: Churchill Livingstone, 1997. p. 55-81.

QUINN, N. E. **Clinical Veterinary Microbiology**. London: Wolfe, 1994.

RAJALA-SCHULTZ, P. J. *et al.* Antimicrobial susceptibility of mastitis pathogens from first lactation and older cows. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, p. 33-42, 2004.

RAMESH, A. *et al.* Application of convenient DNA extraction method and multiplex PCR for the direct detection of *Staphylococcus aureus* and *Yersinia enterocolitica* in milk samples. **Molecular and Cellular Probes**, London, v. 16, p. 307-14, 2002.

RAPINI, L. S. *et al.* Perfil de resistência antimicrobiana de cepas de *Staphylococcus* sp. isoladas de queijo tipo coalho. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 56, n. 1, p. 130-133, 2004.

RAPINI, L. S. *et al.* Resistência antimicrobiana de cepas de *Staphylococcus* sp. enterotoxigênicas isoladas de queijo tipo coalho. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 17, p. 104-105, 2003.

RAVEL, R. **Laboratório Clínico: Aplicações Clínicas dos Dados Laboratoriais**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. p. 162-163.

REN, K. *et al.* Characterization and biological properties of a new staphylococcal exotoxin. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 180, p. 1675-1683, 1994.

RIBEIRO DE SÁ *et al.* Perfil microbiológico do queijo minas frescal comercializado no município de Uberlândia-MG. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 17, p. 169, 2003.

RODRIGUES DA SILVA, E.; DA SILVA, N. Coagulase gene typing of *Staphylococcus aureus* isolated from cows with mastitis in southeastern Brazil. **Canadian Journal of Veterinary Research**, Ottawa, v. 69, p. 260-264, 2005.

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

ROSEC, J. P. *et al.* Enterotoxin production by staphylococci isolated from foods in France. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 35, p. 213-221, 1997.

ROSSI, F. S.; CECCON, M. E. J. R.; KREBS, V. L. J. Infecções estafilocócicas adquiridas nas unidades de terapia intensiva neonatais. **Pediatria**, São Paulo, v. 27, n. 1, p. 38-47, 2005.

RUUD, H. D. *et al.* The prevalence of the *Staphylococcus aureus* tst gene among community- and hospital-acquired strains and isolates from Wegener's Granulomatosis patients. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 245, p. 185-189, 2005.

RUZIN, A.; LINDSAY, J.; NOVICK, R. P. Molecular genetics of SaPI1 - a mobile pathogenicity island in *Staphylococcus aureus*. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 41, p. 365-377, 2001.

SALASIA, S. I. O. *et al.* Comparative studies on pheno and genotypic properties of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis in Java in Indonesia and Hesse in Germany. **Journal of Veterinary Science**, Suwon, v. 5, p. 103-109, 2004.

SANTOS, E. C.; GENIGEORGES, C.; FARVER, T. B. Prevalence of *Staphylococcus aureus* in raw and pasteurized milk used for commercial manufactured Brazilian Minas cheese. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 44, n. 3, p. 177-184, 1981.

SANTOS, F. A.; NOGUEIRA, N. A. P.; CUNHA, G. M. A. Aspectos microbiológicos do queijo tipo “coalho” comercializado em Fortaleza, CE. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 13, n. 1, p. 31-361, 1995.

SANTOS, F. G. B. *et al.* Tipagem molecular de *Staphylococcus aureus* isolados do leite de vacas com mastite subclínica e equipamentos de ordenha procedentes do estado de Pernambuco. **Revista Nappama**, São Paulo, v. 6, p. 19-23, 2003.

SATO, H. *et al.* A new type of staphylococcal exfoliative toxin from a *Staphylococcus aureus* strain isolated from a horse with phlegmon. **Infection and Immunity**, Washington, v. 62, n. 9, p. 3780-3785, 1994.

SAUER, G.C. **Skin Diseases**. Manual of Skin Diseases. 6. ed. Philadelphia: J. B. Lippincott, 1991. 419p.

SCHERRER, D. *et al.* Phenotypic and genotypic characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from raw bulk-tank milk samples of goats and sheep. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 101, p. 101-107, 2004.

SCHLEGELOVÁ, J. *et al.* *Staphylococcus aureus* isolates from dairy cows and humans on a farm differ in coagulase genotype. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 92, p. 327-334, 2003.

SCHLEIFER, K. H.; KROPPESTEDT, R.M. Chemical and molecular classification of staphylococci. **Society for Applied Bacteriology**, New York, v. 19, p. 9S-24S, 1990.

SCHLIEVERT, P. M. Role of superantigens in human disease. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 167, p. 997-1002, 1993.

SCHOLZ, W. **Elaboración de quesos de oveja y de cabra**. Zaragoza: Acribia, 1997. 145p.

SCIENCE PHOTO LIBRARY. **Ritter's disease or scalded skin syndrome on child.**

Disponível em: <http://www.sciencephoto.com/images/showEnlarged.html/M250035-Ritters_disease_or_scalded_skin_syndrome_on_child-SPL.jpg?id=772500035>. Acesso em: 10 nov. 2007.

SCIENCE PHOTO LIBRARY. **Staphylococcus aureus bacteria, SEM.** Disponível em:

<http://www.sciencephoto.com/images/showEnlarged.html/B234113-Staphylococcus_aureus_bacteria,_SEM-SPL.jpg?id=662340113>. Acesso em: 15 out. 2007.

SENA, M. J. **Perfil epidemiológico, resistência a antibióticos e aos conservantes nisina e sistema lactoperoxidase de *Staphylococcus* sp. isolados de queijos coalho comercializados em Recife-PE.** 2000. 75p. Tese (Doutorado) - Escola Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2000.

SENA, M. J. *et al.* Characterization of the pathogenic microorganisms in White cheese sold in Recife (PE). In: PANAMERICAN CONGRESS ON MASTITIS CONTROL AND MILK QUALITY, 1., 1998. Merida. **Proceedings...** Meridas: UNAM, 1998. p. 524-533.

SHAFER, W. M.; IANDOLO, J. J. Chromosomal locus for staphylococcal enterotoxin B. **Infection and Immunity**, Washington, v. 20, p. 273-278, 1978.

SHALITA, Z.; HERTMAN, I.; SAND, S. Isolation and characterization of a plasmid involved with enterotoxin B production in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 129, p. 317-325, 1977.

SHARMA, N. K.; CATHERINE, E. D. R.; DODD, C. E. R. Development of a single-reaction multiplex PCR toxin typing assay for *Staphylococcus aureus* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 4, p. 1347-1353, 2000.

SHOPSIN, B. *et al.* Use of coagulase gene (*coa*) repeat region nucleotide sequences for typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 38, n. 9, p. 3453-3456, 2000.

SILVA JÚNIOR., E. A. **Manual de Controle Higiênico-Sanitário em Alimentos.** São Paulo: Varela, 1997.

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**, Amsterdam, v. 106, p. 103-107, 2005.

SILVA E. R. *et al.* Hemolysin production by *Staphylococcus aureus* species isolated from mastitic goat milk in Brazilian dairy herds. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 56, p. 271–275, 2005.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos**. São Paulo: Varela, 1997. 295p.

SILVEIRA FILHO, V. M. **Tipagem molecular de *Staphylococcus aureus* isolados de casos de mastite bovina no estado de Pernambuco**. 2007. 102p. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2007.

SMITH, A. J.; JACKSON, M. S.; BAGG, J. The ecology of *Staphylococcus* species in the oral cavity. **Journal of Medical Microbiology**, Edinburgh, v. 50, n. 11, p. 940-946, 2001.

SMYTH, D. S. *et al.* Superantigen genes encoded by the *egc* cluster and SaPI_{bov} are predominant among *Staphylococcus aureus* isolates from cows, goats, sheep, rabbits and poultry. **Journal of Medical Microbiology**, Edinburgh, v. 66, p. 1347-1353, 2005.

SOUZA, C. S. Uma guerra quase perdida. **Revista Ciência Hoje**, São Paulo, v. 23, n. 138, p. 27-35, 1998.

SOUZA, M. V.; REIS, C.; PIMENTA, F. C. Revisão sobre a aquisição gradual de resistência de *Staphylococcus aureus* aos antimicrobianos. **Revista de Patologia Tropical**, Goiânia, v. 34, n. 1, p. 27-36, jan.-abr., 2005.

STEPHAN, R. *et al.* Characterization of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in north-east Switzerland. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 78, p. 373-382, 2001.

STEPHAN, R.; BUEHLER, K.; LUTZ, C. Prevalence of genes encoding enterotoxins, exfoliative toxins and toxic shock syndrome toxin 1 in *Staphylococcus aureus* strains isolated from bulk-tank milk samples in Switzerland. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 57, p. 502-504, 2002.

STEVENS, D. L. Community-acquired *Staphylococcus aureus* infections: increasing virulence and emerging methicillin resistance in the new millennium. **Current Opinion in Infectious Diseases**, London, v. 16, p. 189-191, 2003.

SU, C. *et al.* Coagulase gene polymorphism of *Staphylococcus aureus* isolates from dairy cattle in different geographical areas. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v. 122, p. 329-336, 1999.

SU, Y. C.; WONG, A. C. L. Current Perspectives on Detection of Staphylococcal Enterotoxins. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 60, p. 195-202, 1997.

SU, Y. C.; WONG, A. C. L. Detection of staphylococcal enterotoxin H by an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 59, n. 3, p. 327-330, 1996.

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

TAVARES, W. Bactérias gram positivas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, DF, v. 33, n. 3, p. 281-301, 2000.

TENOVER, F. C. *et al.* Comparison of traditional and molecular methods of typing isolates of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 32, p. 407-415, 1994.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 6. ed. São Paulo: Artmed, 2002. 827 p.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **A reação em cadeia da polimerase**. **Microbiologia**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2000. p. 259.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Bactérias**. **Microbiologia**. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Lesões da síndrome da pele escaldada**. **Microbiologia**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2000. p. 563.

TREMAINE, M. T.; BROCKMAN, D. K.; BETLEY, M. J. Staphylococcal enterotoxin A gene (*sea*) expression is not affected by the accessory gene (*agr*). **Infection and Immunity**, Washington, v. 61, p. 356-359, 1993.

TSEN, H. Y.; CHEN, T. R. Use of polymerase chain reaction for detection of type A, D, and E enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in foods. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 53, p. 88-91, 1992.

VAUTOR, E. *et al.* Genotyping of *Staphylococcus aureus* isolated from various sites on farms with dairy sheep using pulsed-field gel electrophoresis. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 96, p. 69-79, 2003.

VEISSEYRE, R. **Lactologia técnica**: composición recogida, tratamiento y transformacio de la leche. Zaragoza: Acribia, 1998. p. 1-10.

VIEIRA- DA- MOTTA, FOLLY, M. M.; SAKYIAMA, C. C. H. Detection of different *Staphylococcus aureus* strains bovine milk from subclinical mastitis using PCR and routine techniques. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 32, p. 27-31, 2001.

VINTOV, J. A. N. *et al.* Association between phage types and antimicrobial resistance among bovine *Staphylococcus aureus* from 10 countries. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 95, p. 133-147, 2003.

VOJTOV, N.; ROSS, H. F.; NOVICK, R. P. Global repression of exotoxin synthesis by staphylococcal superantigens. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 99, n. 15, p. 10102-10107, 2002.

WALSH, C. Deconstructing vancomycin. **Science**, Washington, v. 284, p. 442-443, 1999.
WIENEKE, A. A.; ROBERTS, D.; GILBERT, R. J. Staphylococcal food poisoning in the United Kingdom, 1969-1990. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v. 110, n. 3, p. 519-531, 1993.

WILEY, B. B.; ROGOLSKY, M. Molecular and serological differentiation of staphylococcal exfoliative toxin synthesized under chromosomal and plasmid control. **Infection and Immunity**, Washington, v. 18, p. 487-494, 1977.

WILSON, A. L. *et al.* Fulminant fatal toxic shock syndrome with *Staphylococcus aureus*. **American Journal of Emergency Medicine**, Philadelphia, v. 25, n. 2, p. 225-226, 2007.

WITTE, W. Ecological impact of antibiotic use in animals on different complex microflora: environment. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v. 14, p. 321-325, 2000.

YAMAGUCHI, T. *et al.* Phage conversion of exfoliative toxin A production in *Staphylococcus aureus*. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 38, p. 694-705, 2000.

YAMAGUCHI, T. *et al.* Identification of the *Staphylococcus aureus* *etd* pathogenicity island which encodes a novel exfoliative toxin, ETD, and EDIN-B. **Infection and Immunity**, Washington, v. 70, n. 10, p. 5835-5845, 2002.

YOSHIDA JÚNIOR, C. *et al.* Antibióticos. **Farmácia Médica**, 2004. Disponível em: <<http://geocities.yahoo.com.br/cyjr2000/home.htm>>. Acesso em: 23 jul. 2004.

ZECCONI, A.; CESARIS, L.; LIANDRIS, E. *et al.* Role of several *Staphylococcus aureus* virulence factors on the inflammatory response in bovine mammary gland. **Microbial Pathogenesis**, London, v. 40, p. 177-183, 2006.

ZECCONI, A.; HAHN, G. *Staphylococcus aureus* in raw milk and human health risk. **Bulletin of the International Dairy Federation**, Bruxelas, v. 345, p.15-18, 2000.

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

ZOTTOLA, E. A. Microbial attachment and biofilm formation: a new problem for the food industry? **Food Technology**, Chicago, v. 48, p. 107-114, 1994.

ZSCHÖCK, M. *et al.* Pattern of enterotoxin genes *seg*, *seh*, *sei* and *sej* positive *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 108, p. 243-249, 2005.

ZYGMUNT, W. A.; BROWDER, H. P.; TAVORMINA, P. A. Lytic action of lysostaphin on susceptible and resistant strains of *Staphylococcus aureus*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 13, p. 845-853, 1967.

APÊNDICE**ARTIGO CIENTÍFICO**

Características fenotípicas e genotípicas de *Staphylococcus aureus* isolados de leite e queijo de coalho em municípios de uma região do estado de Pernambuco, Brasil

I. S. Luz^a, A. F. Campos^a, M. F. L. Freitas^b, V. M. Silveira Filho^a,
N. C. Leal^a, T. C. Leal-Balbino^{a, *}

^a Departamento de Microbiologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM/Fiocruz),
Recife, Pernambuco

^b Faculdade Maurício de Nassau, Recife, Pernambuco

*Autor de correspondência: Tel.: +55 081 2101 2633; fax: +55 081 3453 2449. *Endereço de e-mail:* cristina@cpqam.fiocruz.br (T. C. Leal-Balbino).

Manuscrito a ser submetido para publicação na revista “*International Journal of Food Microbiology*”

Resumo

Staphylococcus aureus é um dos principais patógenos de origem alimentar, pois muitos isolados produzem enterotoxinas (SEs) termoestáveis que causam intoxicação alimentar quando ingeridas. O objetivo deste estudo foi caracterizar feno e genotipicamente *S. aureus* isolados de leite mastítico e queijo de coalho em municípios do estado de Pernambuco, Brasil. A frequência e distribuição de doze genes toxigênicos (*sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, *sei* e *sej*, *tst*, *eta* e *etb*) e do gene da coagulase (*coa*) foram investigadas pela PCR, bem como sua expressão potencial pela RT-PCR. Os perfis de sensibilidade antimicrobiana demonstraram que todos os isolados de *S. aureus* identificados foram susceptíveis a vancomicina (100%), sulfa + trimetoprim (93,62%), enrofloxacina (80,85%) e cloranfenicol (76,6%). Um total de 88 *S. aureus* analisados pela PCR-Uniplex apresentou os genes toxigênicos *seg* + *sei* (25%), *sei* (14,8%), *seg* (13,6%), *seg* + *seh* + *sei* (12,5%), *seg* + *sej* (8%), *seg* + *seh* + *sei* + *sej* (8%), *seh* (6,8%), *seg* + *sei* + *sej* (6,8%), *seg* + *seh* (3,4%) e *seh* + *sei* (1,1%). Em nenhum destes isolados foram detectados os genes das toxinas clássicas *sea-see*, *tst*, *eta* e *etb* pela PCR-Multiplex. A presença apenas de alguns genes toxigênicos na região estudada demonstra uma variação na distribuição geográfica destes genes. A análise do gene *coa* dos 94 isolados de *S. aureus* permitiu distribuí-los em dois coagulotipos: *coa*1= ~750pb (62,8%) e *coa*2= ~1000pb (37,2%) presentes entre os municípios, associados a um ou mais genes toxigênicos, sugerindo que poucos clones estão circulando entre os municípios estudados responsáveis por casos de mastite bovina. Destes, 20 isolados foram selecionados para análise pela RT-PCR. Os transcritos foram positivos em 12/20 *S. aureus* (*seg*, *seh*, *sei*, *seg* + *seh*, *seg* + *sej* e *seg* + *sei* + *sej*, *coa*1 e *coa*2), demonstrando que os *S. aureus* estudados no presente trabalho expressaram os genes responsáveis pelas enterotoxinas e pela coagulase podendo causar quadros de intoxicação alimentar ou outras doenças.

Palavras-chave: *Staphylococcus aureus*; Toxinas; Coagulase; Sensibilidade antimicrobiana

1. Introdução

Doenças de origem alimentar apresentam um grande impacto para a saúde pública, sendo o *S. aureus* a terceira causa mais importante no mundo entre os casos relatados (Asperger e Zangerl, 2003; Normanno et al., 2005; Boerema et al., 2006) e o mais prevalente envolvido nas infecções intramamárias em ruminantes, (Akineden et al., 2001; Cenci-Goga et al., 2003; Boerema et al., 2006) sendo responsável por aproximadamente 30% a 40% de todos os casos de mastite (Asperger e Zangerl, 2003).

O crescimento de *S. aureus* em alimentos representa um risco para o consumidor, pois muitos isolados produzem enterotoxinas (SEs) termoestáveis que causam intoxicação alimentar quando ingeridas (Akineden et al., 2001; Boerema et al., 2006). Estas enterotoxinas são termorresistentes e podem permanecer nos alimentos mesmo quando os *S. aureus* estão ausentes (Jorgensen et al., 2005a). Os sintomas da intoxicação alimentar estafilocócica incluem um quadro inicial (dentro de 1-6h) de náusea, vômito, dores abdominais e diarreia (Jorgensen et al., 2005b). Estes sintomas diminuem dentro de 24-48h, mas a doença pode permanecer por 7-10 dias (Nema et al., 2007).

Alguns estudos têm mostrado que o queijo e outros produtos derivados do leite estavam envolvidos em intoxicações alimentares estafilocócicas no Brasil e em outros países (Anunciação et al., 1994; Adesiyum et al., 1998; Almeida-Filho e Nader-Filho, 2000). Tradicionalmente, cinco tipos antigênicos clássicos de SEs (SEA, SEB, SEC, SED, e SEE) foram reconhecidos. Entretanto, a existência de outros tipos (SEG, SEH, SEI, SEJ, SEK, SEL, SEM, SEN, SEO, SEP, SEQ, SER, SEU e SEV) foram relatados e seus genes descritos (Letertre et al., 2003; Lina et al., 2004; Jorgensen et al., 2005a; Bania et al., 2006; Boerema et al., 2006; Hata et al., 2006; Thomas et al., 2006). Embora os papéis das novas enterotoxinas na intoxicação alimentar não estejam totalmente esclarecidos, *S. aureus* portadores dos genes que codificam SEG, SEH, SEI, SEK, SEL e SEM foram isolados a partir de casos de intoxicação alimentar.

S. aureus também produz outras toxinas como a toxina-1 da síndrome do choque tóxico (TSST-1), caracterizada por febre, hipotensão, rash cutâneo e envolvimento multiorgânico (Chesney, 1997) e as toxinas esfoliativas (ETA e ETB) responsáveis pela síndrome da pele escaldada em crianças e neonatos, termo clínico usado para um espectro de doenças bolhosas da pele (Melish, 1982).

As técnicas da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e da Reação em Cadeia da Polimerase Transcriptase Reversa (RT-PCR) foram utilizadas para a detecção dos genes

toxigênicos e sua atividade de transcrição em isolados de *S. aureus* (Becker et al., 1998; Chen et al., 2004; Chen et al., 2001).

Diferentes métodos de tipagem foram desenvolvidos para a caracterização de isolados de *S. aureus* (Hata et al., 2006). A região 3' terminal do gene da coagulase contém repetições de uma seqüência de 81pb, variando entre os isolados de *S. aureus*. Esta diferença consiste na existência de mais de uma forma alélica do gene *coa*, o que possibilita uma tipagem molecular com base nesse polimorfismo (Goh et al., 1992).

Outro aspecto importante é a presença de resíduos de antibióticos que pode interferir diretamente na qualidade do leite e nos processos industriais, inibindo culturas sensíveis, utilizadas na fabricação de iogurtes. Além disso, pode constituir um problema de saúde pública, levando ao aumento de bactérias resistentes a tratamentos por antibióticos.

Neste estudo, um total de 94 isolados de *S. aureus* foi obtido de leite mastítico e queijo de coalho em diferentes municípios de uma região do estado de Pernambuco, Brasil e caracterizados pela genotipagem realizada através da análise do gene *coa*, dos genes codificadores das toxinas estafilocócicas pela PCR e pela avaliação da expressão potencial destes genes através da RT-PCR.

2. Material e Métodos

2.1. Isolamento e caracterização fenotípica dos S. aureus

O isolamento de 94 *S. aureus* foi realizado a partir de amostras de leite mastítico e queijo de coalho obtidas por demanda espontânea em propriedades de exploração leiteira de cinco municípios de uma região de Pernambuco, Brasil (São Bento do Una, Angelim, Caetés, Correntes e Gravatá). Para a identificação fenotípica, os isolados foram caracterizados como *S. aureus* com base na morfologia das colônias em Agar Base acrescido de 8% de sangue desfibrinado de ovino, produção de hemólise e pigmento.

As características morfotintoriais foram analisadas pelo método de Gram e provas bioquímicas como produção de catalase, coagulase livre e termonuclease (TNase Agar Azul de Ortotoluidina-DNA), segundo Silva et al. (1997), produção de acetoina, fermentação da D-glicose (anaerobiose) e do D-manitol (aerobiose e anaerobiose), segundo Mac Faddin (1980) e os isolados classificados de acordo com Baird-Parker (1990).

2.2. Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos

O teste de susceptibilidade a drogas antimicrobianas dos isolados foi realizado em Agar Mueller-Hinton pelo método de disco difusão de acordo com o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2006). Os agentes antimicrobianos testados incluíram norfloxacin (10 ug), enrofloxacin (5 ug), sulfam + trimetoprim (25 ug), cloranfenicol (30 ug), tetraciclina (30 ug), eritromicina (15 ug), penicilina G (10 U), amoxicilina (10 ug), novobiocina (5 ug), oxacilina (1 ug), vancomicina (30 ug), bacitracina (10 U), lincomicina (2 ug) e gentamicina (10 ug).

2.3. Extração do DNA genômico

O DNA dos *S. aureus* foi extraído baseado no método descrito em Maniatis et al. (1982), exceto que as células foram incubadas a 60°C por 20 minutos com 10 µL (10 mg/mL) de lisozima e 5 µL (10 mg/mL) de proteinase K para lise da parede celular. O DNA obtido foi quantificado após eletroforese em gel de agarose a 1%, usando DNA do bacteriófago λ clivado com enzima de restrição *Hind*III através do programa 1D Image Analysis software, versão 3.5 (Kodak Digital Science).

2.4. Detecção dos genes das enterotoxinas *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see* e genes da toxina-1 da síndrome do choque tóxico (*tst*) e das toxinas esfoliativas (*eta* e *etb*)

Foram realizadas duas reações de PCR-Multiplex, uma para pesquisa dos genes *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see* e outra para pesquisa dos genes *eta*, *etb* e *tst*.

As reações foram preparadas para um volume final de 25 µL contendo 20 pmol de cada *primer*, 200 µM de cada dNTP, 3 mM de MgCl₂, 10 mM Tris-HCl pH 9.0, 50 mM de KCl, 30 ng de DNA genômico e 1,2 U da *Taq* DNA polimerase (Invitrogen, Brasil). As amplificações foram realizadas em termociclador (Biometra) programado para 30 ciclos térmicos, cada um consistindo de 95°C por 1 min (desnaturação), 55°C por 1 min (anelamento) e 72°C por 2 min (extensão). As seqüências dos *primers* utilizados nas reações e tamanho dos segmentos esperados são mostrados na Tabela 1. Foram usadas como controle positivo as cepas padrão de *S. aureus* FRI (Food Research Institute Madison, Wiscosin, EUA) 361 portadora dos genes *sec* e *sed* e FRI MN8 portadora do gene *tst*.

Os produtos de amplificação (amplicons) foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% (m/v), corados com brometo de etídeo (1,5 mg/mL), visualizados e fotografados em transiluminador de UV.

2.5. Detecção dos genes das enterotoxinas *seg*, *seh*, *sei* e *sej*

As reações de PCR-Uniplex foram realizadas separadamente, e consistiram de uma mistura de 20 pmol de cada *primer*, 200 μ M de cada dNTP, 1,5 mM do $MgCl_2$, 10 mM do Tris-HCl pH 9.0, 50 mM de KCl, 20 ng do DNA genômico e 1 U da *Taq* DNA polimerase (Invitrogen, Brasil) em um volume final de 25 μ L. As amplificações foram realizadas em termociclador (Biometra) programado para 50 ciclos térmicos, cada um consistindo de 94°C por 3 min, 94°C por 30 seg, 60°C por 30 seg e 72°C por 30 seg para os genes *seg*, *seh* e *sej*. Para o gene *sei* os ciclos foram programados para 94°C por 30 seg, 60°C por 30 seg e 72°C por 60 seg. A seqüência dos *primers* utilizados nas reações e tamanho dos segmentos esperados são mostrados na Tabela 1. Foi utilizada como controle positivo a cepa padrão de *S. aureus* FRI 361 portadora dos genes *seg*, *sei* e *sej*. Os amplicons foram visualizados como descrito anteriormente.

2.6. Purificação e seqüenciamento dos fragmentos amplificados pela PCR

Os segmentos amplificados pela PCR dos genes *seg*, *seh*, *sei* e *sej* foram purificados com o kit PureLink PCR Purification (Invitrogen, Brasil) e analisados através do seqüenciador automático ABI 3100 (Applied Biosystem, USA). As seqüências dos nucleotídeos obtidas foram analisadas pelos programas: Agrupamento das seqüências de *S. aureus* - *forward* e *reverse* (Huang e Madan, 1999) e comparadas com seqüências depositadas no GenBank: versão 2.2.12 do programa Blast (Altschul et al., 1990).

2.7. Genotipagem do gene da coagulase (*coa*)

A região 3'-terminal do gene *coa* foi amplificada utilizando os *primers* específicos: *COAG2* (ACC ACA AGG TAC TGA ATC AAC G 3') e *COAG3* (5' TGC TTT CGA TTG TTC GAT GC 3') descritos por Aarestrup et al. (1995).

As reações de amplificação foram preparadas contendo 20ng do DNA genômico, tampão PCR 10x (10mM Tris-HCl, pH 9,0; 50mM de KCl), 1,5mM de $MgCl_2$, 1 μ M de cada

primer, 200µM de desoxinucleotídeos trifosfato (dNTP's) e 1U de *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen, Brasil), para um volume final de 25 µL. Foi utilizada como controle positivo a cepa padrão de *S. aureus* ATCC nº 25923 proveniente da *American Type Culture Collection* (ATCC 25923). As amostras foram submetidas a 40 ciclos térmicos, cada um consistindo de 30 seg a 95°C, 2 min a 62°C e 4 min a 72°C.

2.8 Extração do RNA Total

O protocolo para extração do RNA total foi padronizado levando em consideração algumas características dos *S. aureus*, como a lise da parede celular de bactérias Gram-positivas. A obtenção do RNA bacteriano a partir de culturas de *S. aureus* foi realizada após crescimento a 24 e 48 horas, cujas medições da O.D. variaram de 1.2 a 1.6 em meio BHI (Brain Heart Infusion, Biobrás) e centrifugada a 14.000 rpm por 5min. O sedimento foi homogeneizado em 500 µL de tampão TE 10:1 com adição de 10 µL de lisozima (10 mg/mL) e 10 µL de lisostafina (2mg/mL) homogeneizando-se 10 vezes. As amostras foram incubadas em banho-maria a 37°C por 40 min invertendo-se os tubos periodicamente durante o período de incubação. Após centrifugação a 14.000 rpm por 5 min, removeu-se o sobrenadante sendo adicionados posteriormente 500 µL de trizol (Invitrogen, Brasil), homogeneizando-se o conteúdo dos tubos com pipeta automática para lise da parede celular, e 100 µL de clorofórmio refrigerado por amostra, incubando-se por 3 min a temperatura ambiente. Em seguida, foram acrescentados 250 µL de isopropanol em aproximadamente 300 µL do sobrenadante que foram transferidos para um outro tubo, após centrifugação a 14.000 rpm por 15 min. Para precipitação, a suspensão foi mantida a -80°C por 2 horas seguidas por centrifugação por 10 min. O sobrenadante, então, foi desprezado e os tubos invertidos em papel absorvente acrescentando-se posteriormente 200 µL de etanol a 75% para lavagem do sedimento contendo RNA. Após uma breve centrifugação por 2 min, removeu-se cuidadosamente todo o etanol e o precipitado foi ressuscitado em água tratada com DEPC e estocado a -80°C. A qualidade da preparação do RNA foi avaliada em gel de agarose a 1% . A quantificação e pureza do RNA total foram realizadas em espectrofotômetro (Ultrospec 2100 *pro*).

2.9. Análise da expressão dos genes *seg*, *seh*, *sei* e *sej* em *S. aureus* por PCR Transcriptase Reversa (RT-PCR)

O RNA total foi extraído de culturas de *S. aureus* e tratado posteriormente com DNase para degradar DNA genômico contaminante. A síntese do DNAc foi realizada com 1 µL (200 U/µL) da enzima Superscript III Reverse Transcriptase (Invitrogen) ou 1µL (200 U/µL) da enzima MMLV Reverse Transcriptase (USB), 100 ng/µL do RNA total, 1 µL (3 µ/µL) do random *primer* e incubado por 5 min a 25°C, 60 min por 50°C e 15 min por 70°C respectivamente.

Um controle negativo (apenas a mistura de reação, sem adicionar a enzima transcriptase reversa) foi incluído para cada amostra nas reações de RT-PCR realizadas, além de dois controles positivos: a cepa padrão de *S. aureus* FRI 361 portadora dos genes *seg*, *sei* e *sej* e isolados de *S. aureus* portadores do gene *coa*.

Os DNacs obtidos pela RT-PCR foram amplificados por PCR usando os *primers* descritos na Tabela 1. Os produtos finais foram analisados em gel de agarose a 1%.

3. Resultados e Discussão

3.1. Isolamento e caracterização fenotípica dos *S. aureus*

De acordo com as propriedades fenotípicas e bioquímicas, 94 *S. aureus* foram identificados das amostras de leite mastítico e queijo de coalho, sendo 27 provenientes do município de São Bento do Una, nove isolados do município de Angelim, 13 isolados do município de Caetés, sete isolados do município de Correntes e 38 originados do município de Gravatá, todos localizados numa região do estado de Pernambuco, Brasil (Fig. 1).

Destes, 88 foram oriundos de amostras de leite em todos os municípios avaliados e seis de amostras de queijo de coalho coletados e isolados apenas do município de Gravatá. Elevados índices de *S. aureus* foram constatados no leite e no queijo tanto no Brasil (Ritter et al., 2001; Benevides e Telles 2002; Barbosa et al. 2004) como em outros países do mundo (Cremonesi et al., 2005; Katsuda et al., 2005; Normanno et al. 2005; Moon et al., 2007).

De Buyser et al. (2001) estimaram a proporção de doenças de origem alimentar, devido ao leite e produtos derivados, registrados na França e em outros países industrializados, observando que no Reino Unido ocorreram vários surtos nos quais o leite e o queijo foram confirmados como o veículo pelo isolamento de *S. aureus*.

Leite e produtos derivados apesar de nutritivos para o homem, constituem-se em excelentes meios para o desenvolvimento de microrganismos deteriorantes e patogênicos, podendo desencadear surtos de toxinfecção alimentar, demonstrando a necessidade de melhoria nas condições higiênico-sanitárias na cadeia produtiva do leite.

3.2. Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos

Todos os 94 isolados de *S. aureus* foram susceptíveis a vancomicina (100%), sulfa + trimetoprim (93,62%), enrofloxacina (80,85%) e cloranfenicol (76,6%). A maioria dos isolados de *S. aureus* foi resistente à penicilina (11,7%), lincomicina (19,15%), amoxicilina (26,6%) e eritromicina (31,91%). Os isolados originados do município de São Bento do Una apresentaram um elevado índice de resistência aos 14 antibióticos analisados. Dos 67 isolados pertencentes aos demais municípios, apenas 6,06% apresentaram este grau de multirresistência (Tab. 2).

Esta alta sensibilidade a vancomicina se explica devido ao pouco uso deste antibiótico na medicina veterinária, pois em nenhum dos municípios analisados este medicamento era utilizado. Desta forma, como descrito por Howe (2004), torna-se o antimicrobiano de eleição em casos de infecções por isolados de *S. aureus* multirresistentes. A resistência à penicilina e a outros antibióticos desenvolvida por *S. aureus* ocorre no mundo inteiro, embora as taxas de prevalência relatadas indiquem que grandes variações existam regionalmente (De Oliveira et al., 2000; Waage et al., 2002; Normanno et al., 2007).

Os beta-lactâmicos, como a penicilina e amoxicilina cujos isolados de *S. aureus* revelaram altos índices de resistência neste estudo, têm sido um dos agentes antimicrobianos mais utilizados no tratamento de algumas infecções de origem estafilocócica. Portanto, estes antimicrobianos são os menos indicados para o tratamento da mastite nas propriedades estudadas.

3.3. Investigação dos genes *sea-see*, *seg-sej*, *eta-etb* e *tst*

As análises para pesquisa dos genes toxigênicos pelas PCRs-Uniplex demonstraram que 88/94 (93,6%) identificaram os genes responsáveis pela produção das enterotoxinas SEG, SEH, SEI e SEJ, dos quais 31/88 (35,2%) amplificaram apenas para um gene, 33/88 (37,5%) amplificaram para dois genes, 17/88 (19,3%) amplificaram para três genes e 7/88 (8%)

amplificaram para os quatro genes, permitindo classificar os fragmentos de tamanho esperado dentro de 10 grupos genotípicos para a presença dos genes toxigênicos (Tab. 3).

Entre os isolados positivos para os genes toxigênicos *seg*, *seh*, *sei* e *sej*, o genótipo mais freqüentemente observado foi *seg* + *sei* (25%) seguido por *sei* (14,8%), *seg* (13,6%), *seg* + *seh* + *sei* (12,5%), *seg* + *sej* (8%), *seg* + *seh* + *sei* + *sej* (8%), *seh* (6,8%), *seg* + *sei* + *sej* (6,8%), *seg* + *seh* (3,4%) e *seh* + *sei* (1,1%) (Fig. 2A-D, Tab. 3). Nenhum isolado de *S. aureus* referente aos cinco municípios analisados apresentou a associação dos genes *seg* + *seh* + *sej* (Tab. 3).

No município de São Bento do Una foram encontrados os genótipos *seg* (4/27), *sei* (5/27), *seg* + *sei* (8/27), *seg* + *sej* (4/27), *seg* + *sei* + *sej* (1/27), no município de Angelim foi encontrado apenas o genótipo *sei* (8/9), no município de Caetés os genótipos *seg* (3/13), *seg* + *sei* (4/13), *seg* + *sej* (2/13), *seg* + *seh* (3/13), *seg* + *sei* + *sej* (1/13), no município de Correntes os genótipos *seh* (6/7), *seh* + *sei* (1/7) e no município de Gravatá foram encontrados os genótipos *seg* (5/38), *seg* + *sei* (10/38), *seg* + *sej* (1/38), *seg* + *seh* + *sei* (11/38), *seg* + *sei* + *sej* (4/38), *seg* + *seh* + *sei* + *sej* (7/38) (Fig. 2A-D; Tab. 3). Entre os seis *S. aureus* provenientes de amostra de queijo de coalho do município de Gravatá, foram encontradas as associações *seg* + *sei* (1/6), *seg* + *sej* (1/6), *seg* + *sei* + *sej* (2/6), *seg* + *seh* + *sei* + *sej* (2/6).

A combinação de *seg* e *sei* foi freqüentemente detectada nos isolados de *S. aureus* de casos de intoxicação alimentar em diferentes países (Cha et al., 2006; Rosec e Gigaud, 2002; Chiang et al., 2006; Omoe et al., 2002). Estes genes coexistem num elemento genético comum, chamado *enterotoxin gene cluster* (*egc*), estando o gene *sei* localizado a 2002 pb “upstream” do gene *seg* (Jarraud et al., 1999).

O gene *seh* foi detectado em 28/88 (31,8%) dos *S. aureus*, isoladamente ou em associação com *seg*, *sei* e *sej*, sendo estes resultados divergentes dos descritos por outros autores, pois baixos percentuais (inferiores a 16%) ou a não detecção do gene *seh* já foi relatada (Omoe et al., 2002; Salasia et al., 2004; Cremonesi et al., 2005; Jorgensen et al., 2005a; Zschöck et al., 2005). No entanto, resultados semelhantes foram encontrados por Kuzma et al. (2003) que, analisando 83 *S. aureus* isolados de vacas com mastite, observaram uma freqüência de 35% de isolados portadores do gene *seh*.

Em um surto de intoxicação alimentar causado por purê de batata feito com leite cru, observou-se a presença de isolados de *S. aureus* portadores apenas do gene *seh*, sendo a pesquisa para as enterotoxinas clássicas (SEA-SEE) negativa (Jorgensen et al. 2005c). Os isolados testados produziram quantidades significantes (98 a 108 ng) de SEH, demonstrando

que isolados de *S. aureus* portadores do gene *seh* podem causar surtos de intoxicação alimentar.

Nenhum dos 94 isolados de *S. aureus* avaliados pela PCR-Multiplex comportava os genes *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *tst*, *eta* e *etb* havendo apenas a amplificação dos segmentos de tamanho esperado nas cepas de referência (FRI) usadas como controle positivo.

Muitos isolados de *S. aureus* analisados por outros pesquisadores portavam os genes *seg*, *seh*, *sei* e *sej* que não eram acompanhados pelos genes codificadores das enterotoxinas clássicas (Akineden et al., 2001; Rosec e Gigaud et al., 2002; Blaiotta et al., 2004).

Freitas (2006) analisando 81 *Staphylococcus* spp. originados de leite de vacas com mastite subclínica identificaram os genes *seg-sej* em 65/81 (80,2%) dos isolados, não detectando a presença dos genes das enterotoxinas clássicas. Os resultados de um estudo conduzido por Bania et al. (2006) demonstraram uma alta frequência dos genes para as enterotoxinas SEG-SEJ, SEK-SEQ e SEU em comparação com os genes das enterotoxinas clássicas.

As variações observadas na distribuição dos genes toxigênicos neste e em outros estudos realizados podem estar relacionadas às diferenças geográficas, devido a diferentes condições ambientais, bem como à natureza dos isolados de *S. aureus*.

A análise dos resultados com o programa Blast revelou alta homologia dos genes *seg*, *seh*, *sei* e *sej* nos isolados investigados quando comparados com seqüências depositadas no GenBank: 98%, 99%, 99% e 95%, respectivamente. Estes resultados confirmam a presença dos genes *seg*, *seh*, *sei* e *sej* nos isolados analisados.

3.4. Genotipagem do gene da coagulase (*coa*)

Todos os 94 isolados de *S. aureus* provenientes dos cinco municípios investigados (São Bento do Una, Angelim, Caetés, Correntes e Gravatá) amplificaram dois fragmentos do gene *coa* pela PCR, permitindo distribuí-los em dois coagulotipos de acordo com o tamanho dos segmentos de amplificação: *coa1*= ~750 pb (62,8%, cinco *repeats* em *tandem*; n=5) e *coa2*= ~1000 pb (37,2%, oito *repeats* em *tandem*; n=8). A cepa padrão utilizada como controle positivo (*S. aureus* ATCC 25923) amplificou um fragmento de ~800 pb (Fig. 3).

Este resultado está em concordância com estudos prévios, que mostraram que poucos clones de *S. aureus* tiveram ampla distribuição geográfica em diferentes países responsáveis por casos de mastite bovina (Fitzgerald et al., 1997; Annemüller et al., 1999; Lange et al., 1999).

Os dois perfis genotípicos obtidos para o gene da coagulase dos 88 isolados foram classificados de acordo com os genes responsáveis pela produção das enterotoxinas SEG, SEH, SEI e SEJ, sendo correlacionados os seguintes genótipos: *coa1* (*seg + seh + sei + sej*), (*seg + seh + sei*), (*seg + sei + sej*), (*seg + sei*), (*seg*), (*seg + seh*) (*seh*), (*sei*) e *coa2* (*seg + sei + sej*), (*seg + seh*), (*seg + sei*), (*seg + sej*), (*seh + sei*), (*seg*), (*seh*) e (*sei*).

Os dois coagulotipos apresentaram um ou mais genes toxigênicos não havendo uma correlação clara entre os perfis do gene da coagulase e dos genes toxigênicos. O coagulotipo de 750 pb diferiu em duas associações (*seg + seh + sei* e *seg + seh + sei + sej*) e o coagulotipo de 1000 pb, em apenas uma associação entre os genes toxigênicos (*seh + sei*). A tabela 4 representa a relação entre os genes toxigênicos e o genótipo da coagulase dos isolados de *S. aureus*.

A produção de toxinas superantigênicas por alguns clones possibilita a inibição do sistema imune e sobrevivência da bactéria no hospedeiro (Ferens et al., 1998). Quando patógenos de múltiplos genótipos infectam um hospedeiro, competem por uma fonte de nutrição e transmissão. Nestas condições, os patógenos portando um genótipo com um maior número de características de virulência é mais competitivo (Su et al., 1999).

A pesquisa do gene *coa* revelou a predominância de um clone (*coa1*) de *S. aureus* nos municípios investigados, sugerindo que este clone possui propriedades especiais para superar os mecanismos de defesa do hospedeiro e estabelecer a infecção (Vautor et al., 2003). De acordo com Su et al. (1999), poucos genótipos *coa* predominantes foram mais resistentes à fagocitose do que os genótipos raros.

3.5. Expressão dos genes *seg*, *seh*, *sei* e *sej* em *S. aureus*

A transcrição dos RNAs referentes aos genes *seg*, *seh*, *sei* e *sej* foi examinada pela RT-PCR em 20 isolados de *S. aureus*, sendo um representado pela cepa padrão de *S. aureus* FRI 361 e 19 isolados provenientes dos cinco municípios de uma região do estado de Pernambuco, Brasil, que portavam um ou mais genes positivos pela PCR Uniplex.

A seleção destes isolados foi baseada na distribuição dos genes responsáveis pela produção das enterotoxinas SEG, SEH, SEI e SEJ e no envolvimento das mesmas em surtos de intoxicação alimentar já relatados, uma vez que aproximadamente 5% dos casos de intoxicação alimentar nos quais nenhuma das enterotoxinas clássicas foi detectada, puderam ser atribuídos às demais enterotoxinas (Su e Wong, 1995; Rosec e Gigaud, 2002).

Para padronização da técnica da RT-PCR e obtenção do DNAc foi utilizada a cepa padrão de *S. aureus* FRI 361 (portadora dos genes *seg*, *sei* e *sej*) cujo RNA utilizado nas reações foi avaliado a concentrações variáveis de 10 ng/μL, 100 ng/μL e 1000 ng/μL.

Amplificações do DNAc após a realização das PCRs para os transcritos *seg* e *sej* revelaram igual eficiência com as diferentes concentrações do RNA molde, com exceção para o transcrito *sei* em que não houve amplificação do DNAc originado a partir do RNA a concentração de 10 ng/μL. Desta forma, todas as reações de RT-PCR partiram da incubação de 100ng do RNA total para os 20 isolados de *S. aureus* investigados.

Devido ao polimorfismo do gene da coagulase ser utilizado como marcador epidemiológico através de técnicas de caracterização de *S. aureus* e como controle adicional das reações de RT-PCR e da integridade dos DNacs, a expressão do gene *coa* também foi avaliada pela PCR.

Assim como na genotipagem do gene *coa* para os 94 isolados de *S. aureus* provenientes dos cinco municípios investigados, os 20 isolados de *S. aureus* selecionados amplificaram dois coagulotipos: *coa1*= ~750 pb (58%) e *coa2*= ~1000 pb (42%). A cepa padrão também amplificou um fragmento de ~800 pb (Fig. 4A-B). A distribuição dos genes *seg*, *seh*, *sei* e *sej* entre os 20 isolados de *S. aureus* assim como os respectivos coagulotipos estão listados na tabela 4.

Dos 12/20 isolados positivos para os RNAs transcritos de *seg*, *seh*, *sei* e *sej*, 4/12 apresentaram apenas *seg* (20SB, F, I e 1G), 4/12 apresentaram *seh* (CR2, CR6, 19G, 53G), 1/12 apresentou *sei* (7A), 1/12 apresentou a associação *seg* + *seh* (85G), 1/12 apresentou a associação *seg* + *sej* (C) e 1/12 apresentou a associação *seg* + *sei* + *sej*. Esta última associação foi verificada apenas na cepa padrão FRI 361 usada como controle positivo (Fig. 5A-B; Tab. 4).

No entanto, a produção de toxinas em quantidades suficientes para causar doenças pelos isolados de *S. aureus* portadores destes genes ainda é necessária (Omoe et al., 2005). Apenas a detecção dos genes toxigênicos em *S. aureus* não implica que estes isolados produzam SEs em nível suficiente para causar quadros de intoxicação alimentar ou outras doenças associadas as enterotoxinas (Chiang et al., 2008), devido à produção das SEs também estar relacionada a fatores ambientais (pH, atividade de água, atmosfera).

A RT-PCR tem sido usada para examinar a transcrição de RNAm em isolados de *S. aureus* portadores de *seg*, *seh* e *sei* (Omoe et al., 2002). Os resultados obtidos neste estudo demonstraram a expressão potencial dos genes *seg*, *seh*, *sei* e *sej* em 12/20 isolados de *S. aureus* com predominância dos transcritos *seg* e *seh* isoladamente e em associação (11/12).

Apesar da transcrição dos RNAm ter sido realizada em uma amostragem pequena de isolados de *S. aureus*, a relevância da presença dos genes *seg*, *seh*, *sei* e *sej*, isoladamente e em associação, foi enfatizada pela possível produção de suas respectivas enterotoxinas.

Omoie et al. (2002) demonstraram que a maior parte dos isolados de *S. aureus* que foram responsáveis por surtos de intoxicação alimentar, portadores do gene *seh* foram capazes de produzir uma quantidade significativa da enterotoxina SEH por imunoenaios. Entretanto, muitos destes *S. aureus* portadores também de *seg* e *sei* não produziram um nível detectável de SEG ou SEI *in vitro*, enquanto que a análise pela RT-PCR mostrou que os RNAm de SEG e SEI foram transcritos nos isolados de *S. aureus* portadores dos genes *seg* e *sei*.

Portanto, é razoável sugerir que o risco de intoxicação alimentar por *S. aureus* pode ser efetivamente avaliado com base na expressão do RNAm correspondente. Assim, pode-se determinar que os *S. aureus* positivos pela PCR e RT-PCR examinados neste estudo expressaram os genes responsáveis pelas enterotoxinas apresentando potencial para causarem quadros de intoxicação alimentar entre outras doenças.

Conclusões

A presença dos genes *seg*, *seh*, *sei* e *sej* foi altamente distribuída entre os *S. aureus* isolados de leite e queijo de coalho, com predominância da associação *seg* + *sei*, representando um risco potencial para a saúde pública. Deve-se destacar ainda que a presença do gene *seh*, com percentual elevado e sua expressão verificada neste estudo é preocupante, uma vez que já foi verificado que este gene foi capaz de causar surto de intoxicação alimentar. Além disso, o uso indiscriminado de antibióticos nos municípios analisados agrava o problema da resistência múltipla adquirida por *S. aureus* comprometendo a qualidade do leite e de produtos derivados, contaminados por estes isolados. A existência de um coagulotipo predominante do gene *coa* sugere que poucos clones responsáveis pelos casos de mastite podem estar circulando entre os diferentes municípios de uma região do estado de Pernambuco

Agradecimentos

Ao Banco do Nordeste do Brasil e ao PAPES IV / FIOCRUZ pelo financiamento do projeto e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida ao primeiro autor. Os autores agradecem também ao Laboratório de Enterotoxinas Estafilocócicas da Fundação Ezequiel Dias (FUNED-MG) e ao Dr. Luiz Simeão do Carmo por ter cedido as cepas padrão FRI (Food Research Institute Madison, Wiscosin, EUA) utilizadas como controle positivo nas reações de PCR.

Referências

- Aarestrup, F.M., Dangler, C.A., Sordillo, L.M., 1995. Prevalence of coagulase gene polymorphism in *Staphylococcus aureus* isolates causing bovine mastitis. *Canadian Journal of Veterinary Research* 59, 124-128.
- Adesiyun, A.A., Webb, L.A., Romain, H.T., 1998. Prevalence and characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bulk and composite milk and cattle handlers. *Journal of Food Protection* 61, 629-632.
- Akineden, Ö., Annemüller, C., Hassan, A.A.; Lämmler, C., Wolter, W., Zschöck, M., 2001. Toxin genes and other characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from milk of cows with mastitis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 8, 959-964.
- Almeida-Filho, E.S., Nader-Filho, A., 2000. Occurrence of *Staphylococcus aureus* in cheese made in Brazil. *Revista de Saúde Pública* 34, 578-580.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myres, E.W., Lipman, D.J., 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215, 403-410.
- Annemüller, C., Lammler, C.H., Zschöck, M., 1999. Genotyping *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. *Veterinary Microbiology* 69, 217-224.
- Anuniação, L.L.C., Linardi, W.R., Carmo, L.S., Bergdoll, M.S., 1994. Production of staphylococcal enterotoxin A in White cheese. *Brazilian Journal of Microbiology* 25, 68-71.
- Asperger, H., Zangerl, P., 2003. *Staphylococcus aureus*. In: Roginski, H., Fuquay, J.W., Fox, P.F. (Eds), *Encyclopedia of Dairy Sciences*, vol. 4. Academic Press and Elsevier Science, Amsterdam, Boston, London, New York, Oxford, Paris, San Diego, San Francisco, Singapore, Sydney, Tokyo, pp. 2563-2569.
- Baird-Parker, A.C., 1990. The Staphylococci: an introduction. *Journal for Applied Bacteriology Symposium Supplement*, New York, p.1S-8S.
- Bania, J., Dabrowska, A., Bystron, J., Korzekwa, K., Chrzanowska, J., Molenda, J., 2006. Distribution of newly described enterotoxin-like genes in *Staphylococcus aureus* from food. *International Journal of Food Microbiology* 108, 36-41.
- Barbosa, S.S., Trajano, H.M.R., Santos, H.S., Muratori, M.C.S., Lima, F.L. 2004. Detecção de *Staphylococcus* sp em queijos de coalho adquiridos em Teresina-Piauí. In: XIX Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia dos Alimentos-CBCTA, 2004, Recife, Pernambuco. XIX CBCTA Ciência e Tecnologia dos Alimentos: estratégias para o desenvolvimento. Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia dos Alimentos-SBCTA, 2004. 1 CD-ROM.

- Blaiotta, G., Ercolini, D., Pennacchia, C., Fusco, V., Casaburi, A., Pepe, O., Villani, F., 2004. PCR detection of staphylococcal enterotoxin genes in *Staphylococcus* spp. strains isolated from meat and dairy products. Evidence for new variants of *seG* and *seI* in *S. aureus* AB-8802. *Journal of Applied Microbiology* 97, 719-730.
- Becker, K., Roth, R., Peters, G., 1998. Rapid and specific detection of toxigenic *Staphylococcus aureus*: use of two multiplex PCR enzyme immunoassays for amplification and hybridization of staphylococcal enterotoxin genes, exfoliative toxin genes, and toxic syndrome toxin 1 gene. *Journal of Clinical Microbiology* 36, 2548-2553.
- Benevides, S.D., Telles, F.J.S., 2002. Características microbiológicas, de armazenamento e de embalagem de queijos tipo “coalho” comercializados na cidade de Fortaleza, CE. *Higiene Alimentar* 16, 44-47.
- Boerema, J.A., Clemens, R., Brightwell, G., 2006. Evaluation of molecular methods to determine enterotoxigenic status and molecular genotype of bovine, ovine, human and food isolates of *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Food Microbiology* 107, 192-201.
- Cenci-Goga, B.T., Karama, M., Rossitto, P.V., Morgante, R.A., Cullor, J.S., 2003. Enterotoxin production by *Staphylococcus aureus* isolated from mastitis cows. *Journal of Food Protection* 66, 1693-1696.
- Cha, J.O., Lee, J.K., Jung, Y.H., Yoo, J.I., Park, Y.K., Kim, B.S., Lee, Y.S., 2006. Molecular analysis of *Staphylococcus aureus* isolates associated with staphylococcal food poisoning in South Korea. *Journal of Applied Microbiology* 101, 864-871.
- Chen, T.R., Hsiao, M.H., Chiou, C.S., Tsen, H.Y., 2001. Development and use of PCR primers for the investigation of C1, C2, and C3 enterotoxin types of *Staphylococcus aureus* strains isolated from food-borne outbreaks. *International Journal of Food Microbiology* 71, 63-70.
- Chen, T.R., Chiou, C.C., Tsen, H.Y., 2004. Use of novel PCR primers specific to the genes of staphylococcal enterotoxin G, H, I for the survey of *Staphylococcus aureus* strains isolated from food-poisoning cases and food samples in Taiwan. *International Journal of Food Microbiology* 92, 189-197.
- Chesney, P.J., 1997. Toxic shock syndrome. In: Crossley K.B., Archer, G. L. (eds). *The staphylococci in human disease*. New York, Churchill Livingstone, 509-525.
- Chiang, Y-C., Chang, L.T., Lin, C.W., Yang, C.Y., Tsen, H-Y., 2006. PCR primers for the detection of Staphylococcal enterotoxins (SEs) K, L, M and survey of SEs types in

- Staphylococcus aureus* isolates from food-poisoning cases in Taiwan. *Journal of Food Protection* 69, 1072-1079.
- Chiang, Y-C., Liao, W-W., Fan, C-M., Pai, W-Y., Chiou, C-S., Tsen, H-Y., 2008. PCR detection of Staphylococcal enterotoxins (SEs) types in *Staphylococcus aureus* isolates from food-poisoning cases in Taiwan. *International Journal of Food Microbiology* 121, 66-73.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2006. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Wayne.
- Cremonesi, P., Luzzana, M., Brasca, M., Morandi, S., Lodi, R., Vimercati, C., Agnellini, D., Caramente, G., Moroni, P., Castiglioni, B., 2005. Development of multiplex PCR assay for the identification of *Staphylococcus aureus* enterotoxigenic strains isolated from milk and dairy products. *Mol. Cell. Probes*. 19, 299-305.
- De Buyser, M.L., Dufour, B., Maire, M., Lafarge, V., 2001. Implication of milk and milk products in food-borne diseases in France and in different industrialised countries. *International Journal of Food Microbiology* 67, 1-17.
- De Oliveira, A.P., Watts, J.L., Salmon, S.A., Aarestrup, F.M., 2000. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Europe and the United States. *Journal of Dairy Science* 83, 855-862.
- Ferens, W.A., Davis, W.C., Hamilton, M.J., Park, Y.H., Deobald, C.F., Fox, L., Bohach, G., 1998. Activation of bovine lymphocyte subpopulations by staphylococcal enterotoxin C. *Infection and Immunity* 66, 573-580.
- Fitzgerald, J.R., Monday, S.R., Foster, T.J., Bohach, G.A., Hartigan, P.J., Meaney, W.J., Smyth, C.J., 2001. Characterization of putative pathogenicity island from bovine *Staphylococcus aureus* encoding multiple superantigens. *Journal of Bacteriology* 183, 63-70.
- Freitas, M.F.L. Caracterização fenotípica e genotípica de *Staphylococcus* spp. isolados de queijos de coalho e leite de vacas com mastite no estado de Pernambuco, Brasil. 2006. 200p Tese (Doutorado). Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Nutrição.
- Goh, S-H., Byrne, S.K., Zhang, J.L., Chow, A.W., 1992. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* on the basis of coagulase gene polymorphisms. *Journal of Clinical Microbiology* 30, 1642-1645.
- Hata, E., Katsuda, K., Kobayashi, H., Ogawa, T., Endo, T., Eguchi, M., 2006. Characteristics and epidemiologic genotyping of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitic milk in Hokkaido, Japan. *The Journal of Veterinary Medical Science* 68, 165-170.

- Howe, R.A., 2004. Vancomycin susceptibility within methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* lineages. *Emerging Infectious Diseases* 10, 5, 855-857.
- Jarraud, S., Cozon, G., Vandenesch, F., Bes, M., Etienne, J., Lina, G., 1999. Involvement of enterotoxins G and I staphylococcal toxic shock syndrome and staphylococcal scarlet fever. *Journal of Clinical Microbiology* 37, 2446-2449.
- Jorgensen, H.J., Mork, T., Rorvik, L.M., 2005a. The occurrence of *Staphylococcus aureus* on a farm with small-scale production of raw milk cheese. *Journal of Dairy Science* 88, 3810-3817.
- Jorgensen, H.J., Mork, T., Caugant, D.A., Kearns, A., Rorvik, L.M., 2005b. Genetic variation among *Staphylococcus aureus* strains from Norwegian bulk milk. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 8352-8361.
- Jorgensen, H., Mathisen, T., Lovseth, A., Omoe, K., Qvale, K.S., Loncarevic, S., 2005c. An outbreak of staphylococcal food poisoning caused by enterotoxin H in mashed potato made with raw milk. *FEMS Microbiology Letters* 252, 267-272.
- Katsuda, K., Hata, E., Kobayashi, H., Kohmoto, M., Kawashima, K., Tsunemitsu, H., Eguchi, M., 2005. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitic milk on the basis of toxin genes and coagulase gene polymorphisms. *Veterinary Microbiology* 105, 301-305.
- Kuzma, K., Malinowski, E., Lassa, H., Klossowska, A., 2003. Detection of genes for enterotoxins and toxic shock syndrome toxin-1 in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. *Bull. Vet. Inst. Pulawy* 47, 419-426.
- Lange, C., Cardoso, M., Senczek, D., Schwarz, S., 1999. Molecular subtyping of *Staphylococcus aureus* isolates from cases of bovine mastitis in Brazil. *Veterinary Microbiology* 67, 127-141
- Letertre C., Perelle, S., Dilasser, F., Fach, P., 2003. Identification of a new putative enterotoxin SEU encoded by the *egc* cluster of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Food Microbiology* 95, 38-43.
- Lina, G., Bohach, G.A., Nair, S.P., Hiramatsu, K., Jouvin-Marche, E., Mariuzza, R., 2004. Standard nomenclature for the superantigens expressed by *Staphylococcus*. *The Journal of Infectious Diseases* 189, 2334-2336.
- Mac Faddin, J.F., 1980. *Biochemical test for identification of medical bacteria*. 2ed. Baltimore Williams & Wilkins, p.527.
- Maniatis, T.; Frisch, E.; Sambrook, J. *Molecular cloning: A Laboratory Manual.*, 1982. 2ed, New York: Cold Spring Harbor Laboratory.

- Melish, M.E., 1982. Staphylococci, streptococci and the skin: review of impetigo and staphylococcal scalded skin syndrome. *Semin Dermatol* 1, 101–109.
- Moon, J.S., Lee, A.R., Kang, H.M., Lee, E.S., Joo, Y.S., Park, Y.H., Kim, M.N., Koo, H.C., 2007. Antibigram and Coagulase Diversity in Staphylococcal Enterotoxin-Producing *Staphylococcus aureus* from Bovine Mastitis 90, 4, 1716-1724
- Nema, V., Agrawal, R., Kamboj, D.V., Goel, A.K., Singh, L., 2007. Isolation and characterization of heat resistant enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* from a food poisoning outbreak in Indian subcontinent. *International Journal of Food Microbiology* 117, 29-35.
- Normanno, G., Firinu, A., Virgilio, S., Mula, G., Dambrosio, A., Poggiu, A., Decastelli, L., Mioni, R., Scuota, S., Bolzoni, G., Di Giannatale, E., Salinetti, A.P., La Salandra, G., Bartoli, M., Zuccon, F., Pirino, T., Sias, S., Parisi, A., Quaglia, N.C., Celano, G.V., 2005. Coagulase-positive staphylococci and *Staphylococcus aureus* in food products marketed in Italy. *International Journal of Food Microbiology* 98, 73-79.
- Normanno, G., La Salandra, G., Dambrosio, A., Quaglia, N.C., Corrente, M., Parisi, A., Santagada, G., Firinu, A., Crisetti, E., Celano, G.V., 2007. Occurrence, characterization and antimicrobial resistance of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from meat and dairy products. *International Journal of Food Microbiology* 115, 290-296.
- Omoe, K., Ishikawa, M., Shimoda, Y. Hu, D., Ueda, S., Shinagawa, K., 2002. Detection of *seg*, *she*, and *sei* genes in *Staphylococcus aureus* isolates and determination of the enterotoxin productivities of *Staphylococcus aureus* isolates harboring *seg*, *seh*, or *sei* genes. *Journal of Clinical Microbiology* 40, 3, 857-862.
- Ritter R., Santos D., Bergmann, G.P., 2001. Análise da qualidade microbiológica de queijo colonial, não pasteurizado, produzido e comercializado por pequenos produtores, no Rio Grande do Sul. *Higiene Alimentar* 15, 51-55.
- Rosec, J. P., Gigaud, O., 2002. Staphylococcal enterotoxin genes of classical and new types detected by PCR in France. *International Journal of Food Microbiology* 77, 61-70.
- Salasia, S.I.O., Khusnan, Z., Lämmler, C., Zschöck, M., 2004. Comparative studies on pheno- and genotypic properties of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis in central Java in Indonesia and Hesse en Germany. *Journal of Veterinary Science* 5, 103-109.
- Silva, N., Junqueira, V.C.A., Silveira, N.F.A., 1997. Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos. São Paulo, SP: Varela, 295p.

- Su, Y.C., Wong, A.C.L., 1995. Identification and purification of a new staphylococcal enterotoxin, H. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 1438-1443.
- Su, C., Herbelin, C., Frieze, N., Skardova, O., Sordillo, L.M., 1999. Coagulase gene polymorphism of *Staphylococcus aureus* isolates from dairy cattle in different geographical areas. *Epidemiol. Infect.* 122, 329-336.
- Thomas, D.Y., Jarraud, S., Lemercier, B., Cozon, G., Echasserieu, K., Etienne, J., Gougeon, M.L., Lina, G., Vandenesch, F., 2006. Staphylococcal enterotoxin-like toxins U2 and V, two new staphylococcal superantigens arising from recombination within the enterotoxin gene cluster. *Infection and Immunity* 74, 4724-4734.
- Vautor, E., Abadie, G., Guibert, J.-M., Huard, C., Pépin, M., 2003. Genotyping of *Staphylococcus aureus* isolated from various sites on farms with dairy sheep using pulsed-field gel electrophoresis. *Veterinary Microbiology* 96, 69-79.
- Waage, S., Bjorland, J., Caugant, D.A., Oppegaard, H., Tollersrud, T., Mork, T., Aarestrup, F.M., 2002. Spread of *Staphylococcus aureus* resistant to penicillin and tetracycline within and between dairy herds. *Epidemiology and Infection* 129, 193-202.
- Zschöck, M., Kloppert, B., Wolter, W., Hamann, H.P., Lämmler, C., 2005. Pattern of enterotoxin genes *seg*, *seh*, *sei* and *sej* positive *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. *Veterinary Microbiology* 108, 243-249.

Tabela 1

Seqüências dos *primers* utilizados para a detecção dos genes responsáveis pela produção das toxinas (SEA-SEE, SEG-SEJ, ETA-ETB e TSST-1), tamanho esperado dos fragmentos e referências

<i>Primers</i>	Seqüência (5' → 3')	Gene	Tamanho do <i>amplicon</i> (pb)	Referências
SEA-3b	cct ttg gaa acg gtt aaa acg	<i>sea</i>	127	Becker <i>et al.</i> , 1998
SEA-4b	tct gaa cct tcc cat caa aaa c			
SEB-1c	tcg cat caa act gac aaa cg	<i>seb</i>	477	Becker <i>et al.</i> , 1998
SEB-4b	gca ggt act cta taa gtg cct gc			
SEC-3b	ctc aag aac tag aca taa aag cta gg	<i>sec</i>	271	Becker <i>et al.</i> , 1998
SEC-4b	tca aaa tcg gat taa cat tat cc			
SED-3b	cta gtt tgg taa tat ctc ctt taa acg	<i>sed</i>	319	Becker <i>et al.</i> , 1998
SED-4b	tta atg cta tat ctt ata ggg taa aca tc			
SEE-3b	cag tac cta tag ata aag tta aaa caa gc	<i>see</i>	178	Becker <i>et al.</i> , 1998
SEE-2c	taa ctt acc gtg gac cct tc			
TST-3	aagccctttgttgcttgcg	<i>tst</i>	445	Becker <i>et al.</i> , 1998
TST-6	atcgaactttggccatacttt			
ETA-3b	ctagtgcattgttattcaagacg	<i>eta</i>	119	Becker <i>et al.</i> , 1998
ETA-4b	tgcatgacacatagctacttattc			
ETB-3b	acg gct ata tac att caa ttc aat g	<i>etb</i>	262	Becker <i>et al.</i> , 1998
ETB-4b	aaa gtt att cat tta atg cac tgt ctc			
SEG-1	acgtctccacctgttgaagg	<i>seg</i>	400	Rosec; Gigaud, 2002
SEG-2	tgagccagtgtcttgccttg			
SEH-1	tcacatcatatgcgaaagcag	<i>seh</i>	357	Rosec; Gigaud, 2002
SEH-2	tagcaccaatcaccctttcc			
SEI-1	ggtgatattggtgtagtaac	<i>sei</i>	454	Omoe <i>et al.</i> , 2002
SEI-2	atccatattcttgcctttaccag			
SEJ-1	cagcgatagcaaaaatgaaaca	<i>sej</i>	426	Rosec; Gigaud, 2002
SEJ-2	tctagcggaaacaacagttctga			

Tabela 2

Percentual de resistência aos antibióticos de 94 *S. aureus* isolados de leite e queijo de coalho de cinco municípios do estado de Pernambuco, Brasil

Município (nº de isolados)	% de resistência a														Média
	NOR	ENO	SUT	CLO	TET	ERI	PEN	AMO	NOV	OXA	VAN	BAC	LIN	GEN	
São Bento do Una (27)	22,22	14,81	3,704	48,15	51,85	96,15	85,19	74,07	66,67	85,19	0	92,59	100	100	60,04
Angelim (9)	0	37,5	12,5	25	12,5	83,33	87,5	62,5	37,5	50	0	100	100	87,5	49,70
Caetés (13)	7,69	0	0	0	7,69	7,69	84,62	84,62	0	0	0	30,77	61,54	7,69	20,88
Correntes (7)	0	0	0	0	14,29	14,29	71,43	71,43	0	0	0	0	0	28,57	14,29
Gravatá (38)	44,74	28,95	10,53	18,42	42,11	84,21	97,37	73,68	78,95	21,05	0	5,26	86,84	2,63	42,48
Total (94)	25,53	19,15	6,38	23,4	35,11	68,09	88,3	73,4	54,26	37,23	0	41,49	80,85	40,42	42,40

NOR = norfloxacina, ENO = enrofloxacin, SUT = sulfa + trimetoprim, CLO = cloranfenicol, TET = tetraciclina, ERI = eritromicina, PEN = penicilina G, AMO = amoxicilina, NOV = novobiocina, OXA = oxacilina, VAN = vancomicina, BAC = bacitracina, LIN = lincomicina e GEN = gentamicina.

Tabela 3

Distribuição dos genes *seg*, *seh*, *sei* e *sej* nos 94 *S. aureus* isolados de leite e queijo de coalho em cinco municípios do estado de Pernambuco, Brasil

Genes Toxigênicos (<i>seg-sej</i>)	Municípios				
	São Bento do Una	Angelim	Caetés	Correntes	Gravatá
<i>seg</i>	4	-	3	-	5
<i>seh</i>	-	-	-	6	-
<i>sei</i>	5	8	-	-	-
<i>seg + seh</i>	-	-	3	-	-
<i>seg + sei</i>	8	-	4	-	10
<i>seg + sej</i>	4	-	2	-	1
<i>seh + sei</i>	-	-	-	1	-
<i>seg + seh + sei</i>	-	-	-	-	11
<i>seg + sei + sej</i>	1	-	1	-	4
<i>seg + seh + sei + sej</i>	-	-	-	-	7
Isolados negativos	5	1	-	-	-
Total de <i>S. aureus</i>	27	9	13	7	38

Tabela 4

Perfil genotípico dos 94 *S. aureus* isolados de leite e queijo de coalho em cinco municípios do estado de Pernambuco, Brasil

Genótipos <i>coa</i>	Genes toxigênicos										Transcritos									
	Coagulotipos			<i>G</i>	<i>H</i>	<i>I</i>	<i>G/H</i>	<i>G/I</i>	<i>G/J</i>	<i>H/I</i>	<i>G/H/I</i>	<i>G/I/J</i>	<i>G/H/I/J</i>	Negativos	<i>G</i>	<i>H</i>	<i>I</i>	<i>G/H</i>	<i>G/J</i>	<i>G/I/J</i>
<i>coa1</i> (750 pb)	8	4	4	1	14	5	-	11	4	7	1	2	4	-	1	1	-	-	-	3
<i>coa2</i> (1000 pb)	4	2	9	2	8	2	1	-	2	-	5	2	-	1	-	-	-	-	-	5
FRI 361 (800 pb)																			1	

G-J: *seg-sej*

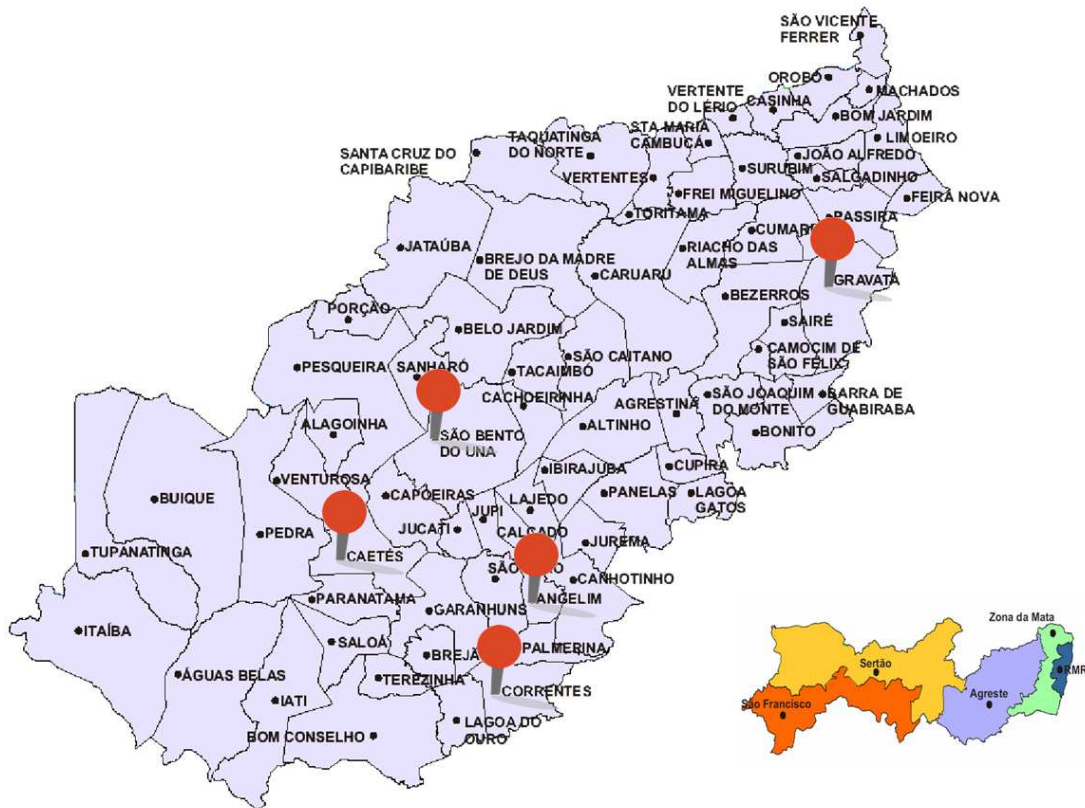


Fig. 1. Municípios onde foram realizadas as coletas de leite e queijo de coalho. Abaixo, mapa do estado de Pernambuco (Brasil), dividido em mesorregiões.

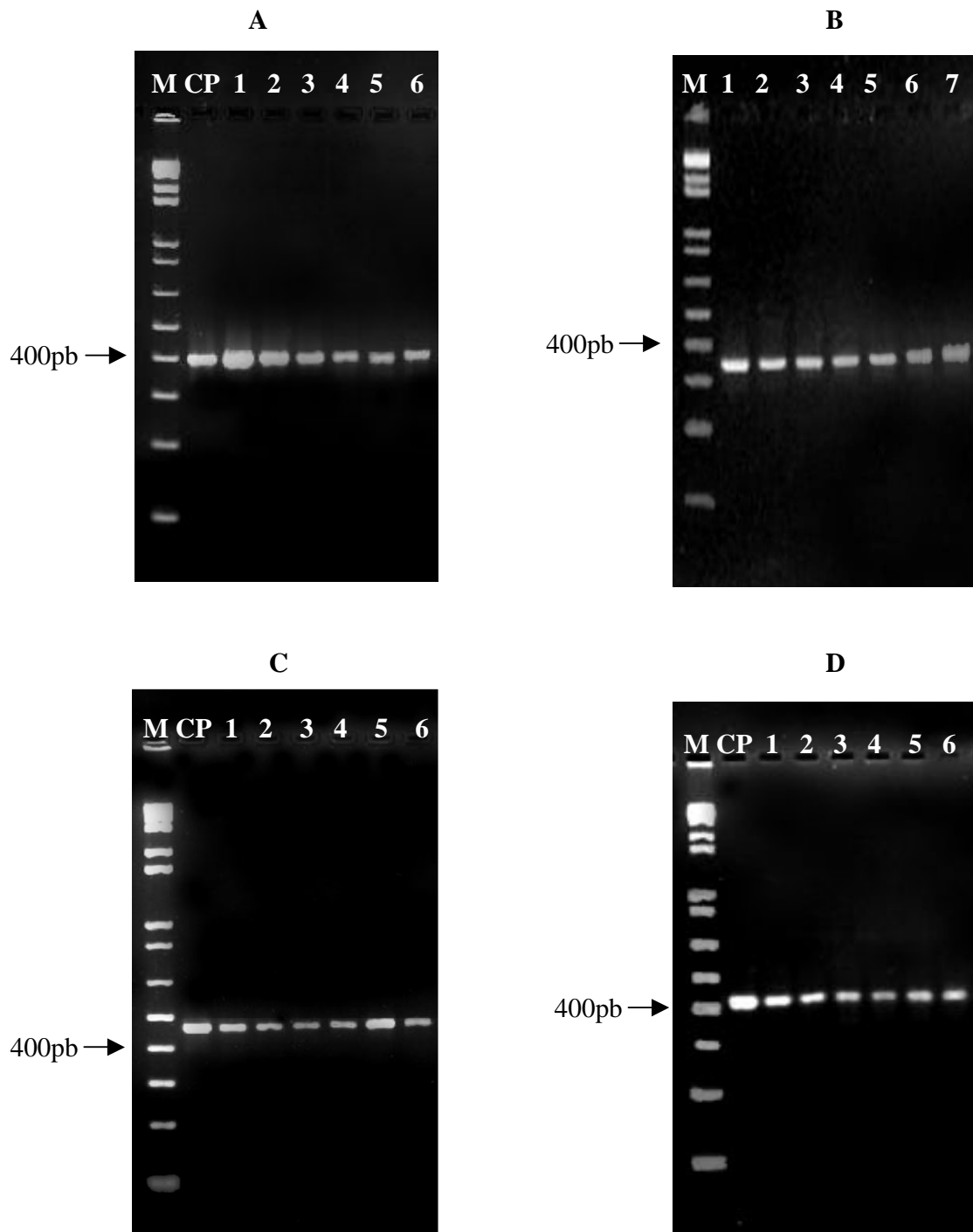


Fig. 2. Produtos de amplificação representativos da PCR-Uniplex dos genes *seg*, *seh*, *sei* e *sej*. Linha **M**, marcador de peso molecular (100pb DNA ladder), linha **CP**- FRI 361. A (*seg*) linha 1- 1G, linha 2- 4G, linha 3- 19G, linha 4- 20G, linha 5- 21G, linha 6- 22G. B (*seh*): linha 1- CR6, linha 2- 1G, linha 3- 4G, linha 4- 19G, linha 5- 20G, linha 6- 21G, linha 7- 22G. C (*sei*): linha 1- 1G, linha 2- 4G, linha 3- 19G, linha 4- 20G, linha 5- 21G, linha 6- 22G. D (*sej*): linha 1- 1G, linha 2- 31G, linha 3- 40G, linha 4- 51G, linha 5- 53G, linha 6- 57G.

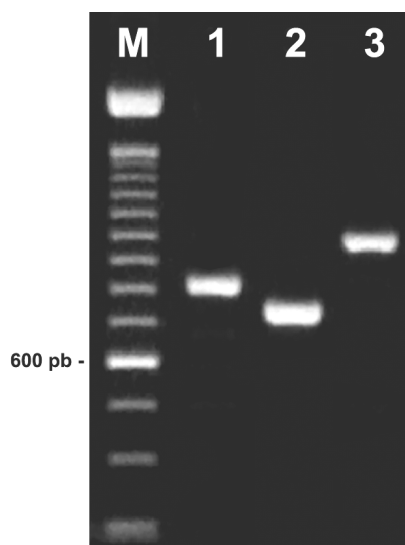


Fig. 3. Perfis eletroforéticos representativos da PCR do gene *coa* de *S. aureus* isolados em municípios do estado de Pernambuco, Brasil. Linha **M**, marcador de peso molecular (100pb DNA *ladder*), controle positivo: linha **1**- *S. aureus* ATCC 25923, linha **2**- Perfil *coa1*: ~750 pb, linha **3**- Perfil *coa2*: ~1000 pb.

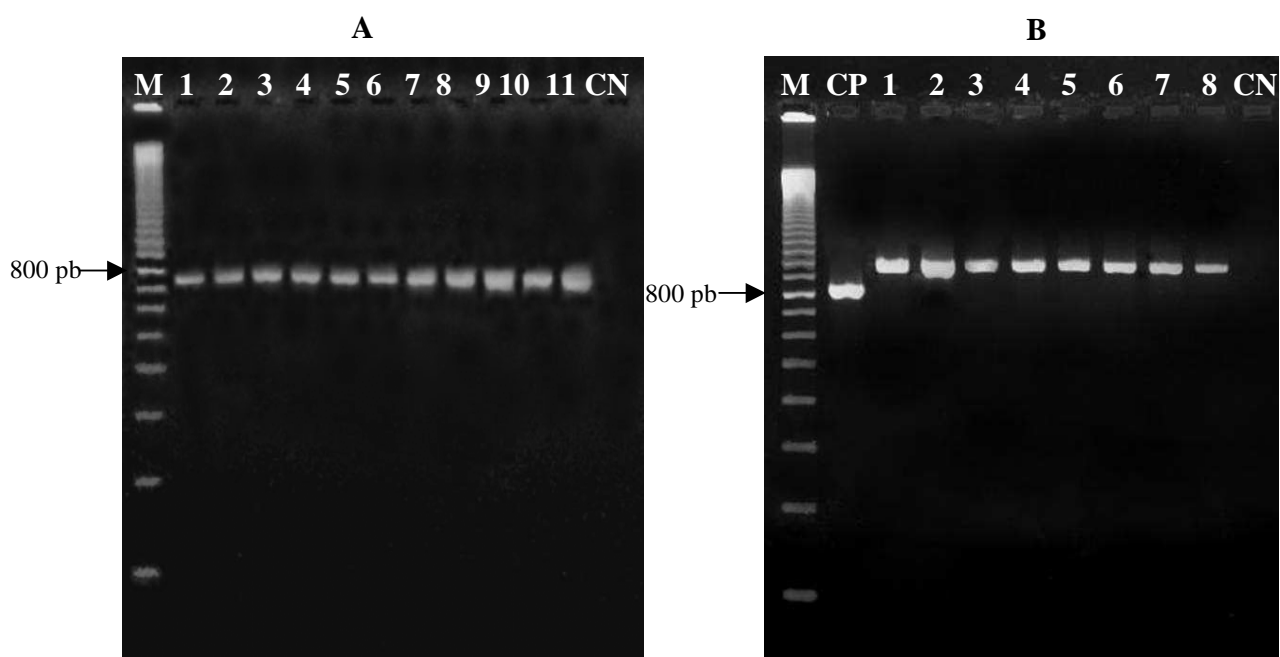


Fig. 4. Amplificação por PCR dos transcritos *coa* nos 20 isolados de *S. aureus* investigados pela RT-PCR. Linha **M**, marcador de peso molecular (100pb DNA *ladder*), linha **CP**- FRI 361, **CN**- controle negativo. A (*coa1*): linha **1**-F, linha **2**- CR6, linha **3**- 19G, linha **4**- 53G, linha **5**- 85G, linha **6**- 99G, linha **7**- 100G, linha **8**- C, linha **9**- 1G, linha **10**- 51G, linha **11**- CR2. B (*coa2*): linha **1**- 5A, linha **2**- 7A, linha **3**- 10SB, linha **4**- 20SB, linha **5**- 34SB, linha **6**- I, linha **7**- L, linha **8**- CR1.

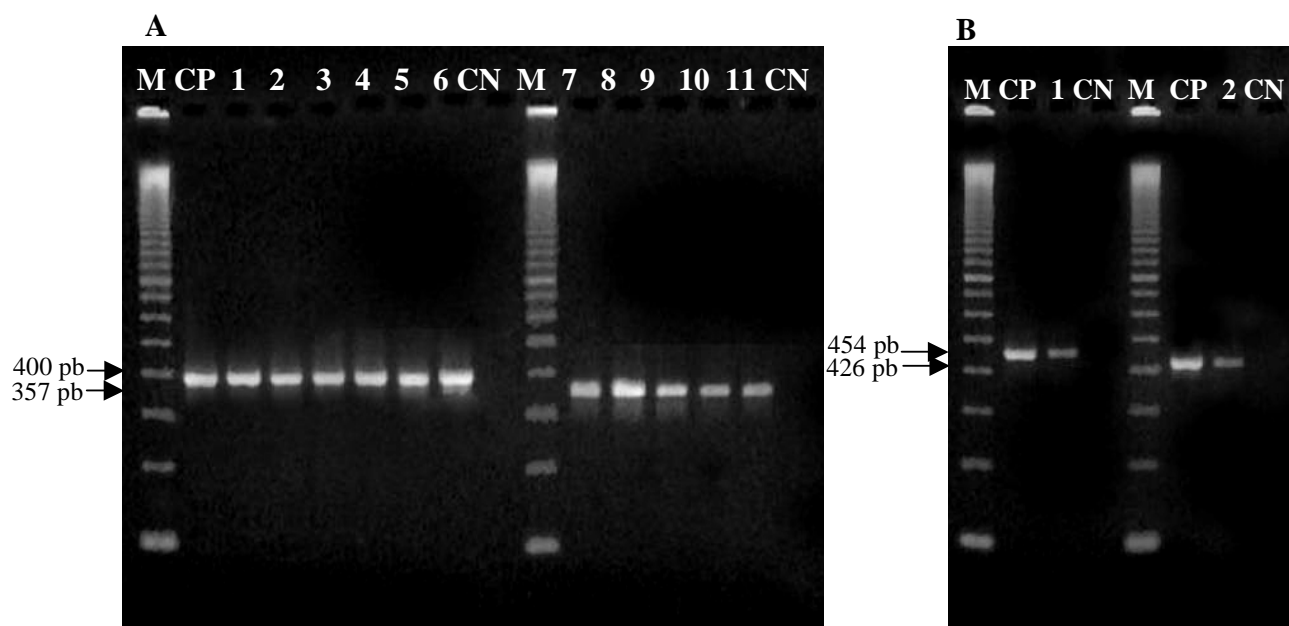


Fig. 5. Amplificação por PCR dos transcritos *seg*, *seh*, *sei* e *sej* nos 12 isolados de *S. aureus* investigados pela RT-PCR. Linha **M**, marcador de peso molecular (100pb DNA ladder), linha **CP**- FRI 361, **CN**- controle negativo. A (*seg* e *seh*): linha **1**-20SB, linha **2**- C, linha **3**- F, linha **4**- I, linha **5**- 1G, linha **6**- 85G, linha **7**- CR2, linha **8**- CR6, linha **9**- 19G, linha **10**- 53G, linha **11**- 85G. B (*sei* e *sej*): linha **1**- 7A, linha **2**- C.

ANEXO A - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa do CPqAM / FIOCRUZ

Título do Projeto: "Caracterização molecular das exotoxinas em Staphylococcus aureus isolados de leite e queijo de coalho em municípios do estado de PE"

Pesquisador responsável: Isabelle da Silva Luz

Instituição onde será realizado o projeto: CPqAM/FIOCRUZ - NESC

Data de apresentação ao CEP: 23/04/2007

Registro no CEP/CPqAM/FIOCRUZ: 23/07

Registro no CAAE: 0023.0.095.000-07

PARECER Nº 010/2007

O Comitê avaliou e considera que o Projeto em questão não envolve procedimentos relacionados às exigências de conduta ética envolvendo seres humanos, de acordo com o Código de Ética, Resolução CNS 196/96 e complementares.

Recife, 04 de maio de 2007.


 **Dr. Zulma Maria de Medeiros**
Biomédica
Coordenadora
CEP/CPqAM/FIOCRUZ

ANEXO B - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa do CPqAM / FIOCRUZ



Título do Projeto: "Caracterização molecular das exotoxinas em *Staphylococcus aureus* isolados de leite e queijo de coalho em municípios do estado de PE"

Pesquisador responsável: Isabelle da Silva Luz

Instituição onde será realizado o projeto: CPqAM/FIOCRUZ - NESC

Data de apresentação ao CEP: 23/04/2007

Registro no CEP/CPqAM/FIOCRUZ: 23/07


Registro no CAAE: 0023.0.095.000-07

DECLARAÇÃO

O Comitê de Ética em Pesquisas do Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães recebeu, em 09/01/2008, a notificação de modificações propostas no projeto supracitado, no tocante a mudança no título. O novo título do projeto passou a ser: "**Caracterização molecular das toxinas em *Staphylococcus aureus* isolados de leite e queijo de coalho em municípios da Região Agreste de Pernambuco**".

O referido projeto foi avaliado na reunião de 02/05/2007, enquadrando-se na categoria SEM IMPLICAÇÃO ÉTICA. O Comitê avaliou e considera que o Projeto em questão não envolve procedimentos relacionados às exigências de conduta ética envolvendo seres humanos, de acordo com o Código de Ética, Resolução CNS 196/96 e complementares (Parecer nº 010/2007, emitido em 04/05/2007).

Recife, 23 de janeiro de 2008


Aldemir Fernandes Freyre
Professor
Vice-Coordenador
CEP/CPqAM/FIOCRUZ