



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES



Mestrado em Saúde Pública

**Mariana de Azevedo Andrade**

---

**Tipagem molecular e investigação dos genes  
toxigênicos em *Staphylococcus aureus*  
isolados de amostras clínicas.**

---

RECIFE  
2008

Mariana de Azevedo Andrade

**Tipagem molecular e investigação dos genes toxigênicos em *Staphylococcus aureus* isolados de amostras clínicas.**

Dissertação apresentada ao 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

---

A553t Andrade, Mariana de Azevedo.

Tipagem molecular e investigação dos genes toxigênicos em *Staphylococcus aureus* isolados de amostras clínicas. / Mariana de Azevedo Andrade — Recife: M. A. Andrade, 2008.

124 f.: il.

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

Orientadoras Tereza Cristina Leal Balbino, Nilma Cintra Leal.

1. *Staphylococcus aureus*. 2. Exotoxinas. 3. Ribotipagem. 4. Coagulase. I. Balbino, Tereza Cristina Leal. II. Leal, Nilma Cintra. Título.

CDU 616.98:579.869

---

Mariana de Azevedo Andrade

**Tipagem molecular e investigação dos genes toxigênicos em *Staphylococcus aureus* isolados de amostras clínicas.**

Dissertação apresentada ao 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**

---

Orientadora: Dra. Tereza Cristina Leal Balbino  
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM)

---

Membro Externo/ Titular: Dra. Janete Magali de Araújo  
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

---

Membro Externo/ Suplente: Dr. José Ronnie Carvalho de Vasconcelos  
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM)

---

Membro Interno/ Titular: Dra. Janaína Campos de Miranda  
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM)

---

Membro Interno/ Suplente: Dr. Fábio André Brayner dos Santos  
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM)

Dedico este trabalho a Deus, senhor de toda sabedoria, ao meu noivo e aos meus pais, que me concederam a dádiva da vida, o amor e a excelente criação.

## AGRADECIMENTOS

A Deus por me abençoar e me acompanhar em todos os momentos da minha vida.

À minha orientadora, Dra. Tereza Cristina (Cris), não só pela excelente orientação, mas também pela amizade, carinho, apoio, incentivo e ensinamentos valiosos. Muito obrigada por confiar em mim e no meu trabalho. A admiro por ser uma grande pessoa e uma profissional bastante competente.

À Dra. Nilma, pela co-orientação e pelos sábios ensinamentos.

Aos meus pais, Ailton e Beth, por toda dedicação, amizade, amor e incentivo. Sempre pacientes nos momentos difíceis, companheiros para todas as horas e pessoas de caráter inestimável. Sou bastante grata por tê-los ao meu lado.

Ao meu noivo Wladi, por tudo o que vivemos e ainda vamos viver juntos. Pelo amor, carinho, dedicação, paciência e amizade dia a dia. Sem o seu apoio seria muito difícil a realização deste trabalho.

A toda minha família pelo incentivo e amor concedidos. Em especial ao meu irmãozinho Danilo (pelo violão nas horas oportunas), às minhas avós, Maria Luiza e Alice (*in memorian*) e aos meus avôs, Aderito (*in memorian*) e José Moreira (*in memorian*). A todos os meus amigos, à família do meu noivo, cunhados e cunhadas pela força e presença constante na minha vida.

Aos amigos do departamento de Microbiologia do CPqAM, em especial Paloma, Vladimir, Rosanny, Carina, Dani, Tamara, Cariri, Mirele, Franklin, Ronnie, Christian, Ana Paula, Larissa, Camilla, Wellington, Isabelle, Alexandra, Cássia, Marise, Fernanda, Silvana, Cláudio e Isaac. Aos amigos do CPqAM, July, Gabriel, Marcelo e Duschinka.

À amiga Mariana Marques pela amizade e apoio durante a graduação e o mestrado. Muito obrigada por tudo!

A todos os membros da banca examinadora por contribuírem com este trabalho, especialmente à Dra. Janaína Campos de Miranda, por aceitar ser parecerista deste trabalho e à Dra. Janete Magali de Araújo pelo apoio, carinho e por acompanhar meus trabalhos desde a graduação.

À minha primeira orientadora, professora Kêsia Xisto, tia Kêsia, pelo estágio de Estágio-Docência, por ser não só uma professora admirável, mas uma tia amorosa e amiga. Aos amigos do Departamento de Antibióticos/UFPE pela amizade, incentivo e apoio sempre.

Aos amigos e professores do curso de Mestrado em Saúde Pública do CPqAM, pelos conhecimentos compartilhados.

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

Aos funcionários da secretaria de pós-graduação e da biblioteca do CPqAM.

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

*“A mente que se abre a uma nova idéia  
jamais voltará ao seu tamanho original”*

Albert Einstein

*“Desmaterializando a matéria  
Com a arte pulsando na artéria  
Boto fogo no gelo da Sibéria  
Faço até cair neve em Teresina  
Com o clarão do raio da silibrina  
Desintegro o poder da bactéria...”*

Zeca Baleiro

---

ANDRADE, Mariana de Azevedo. **Tipagem molecular e investigação dos genes toxigênicos em *Staphylococcus aureus* isolados de amostras clínicas**. 2008. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2008.

---

## RESUMO

Os estafilococos são bactérias oportunistas, vastamente distribuídas na natureza e fazem parte da microbiota normal da pele e mucosas de mamíferos e aves. *Staphylococcus aureus* é o patógeno humano de maior importância entre os estafilococos por causar infecções severas, de origem comunitária e hospitalar. Além de infecções da pele, *S. aureus* pode causar intoxicação alimentar, por produzir enterotoxinas (SEs); Síndrome da Pele Escaldada, causada pela produção de toxinas esfoliativas (ETA e ETB) e síndrome do choque tóxico, causada pela toxina 1 da síndrome do choque tóxico (TSST-1). Neste estudo, foram analisados oitenta isolados clínicos de *S. aureus*, oriundos de diversas fontes de infecção e diferentes setores de um hospital público da cidade do Recife/PE. A PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) foi aplicada para detecção dos genes das toxinas estafilocócicas e uma variação da PCR, a PCR-multiplex, permitiu numa mesma reação detectar vários genes responsáveis pelas exotoxinas, contribuindo para o estudo da epidemiologia da bactéria mencionada e seu envolvimento em infecções humanas. Foi investigada, também, a diversidade dos isolados de *S. aureus* e sua distribuição no ambiente hospitalar, através da análise do polimorfismo da região 3' terminal do gene da coagulase (PCR *coa*) e da região intergênica 16S-23S dos operons ribossomais (ribotipagem-PCR). Os genótipos dos genes toxigênicos encontrados entre os isolados de *S. aureus* foram *seg*, isoladamente, ou em associações, *seg + sec*, *seg + sea*, *seg + seb*, *seg + tst*, *seg + eta*, *seg + seh*, *seg + sec + tst*, *seg + sea + seh*, *seg + sea + seb + seh*. O gene mais freqüente foi *seg*, presente em todas as amostras positivas, 79/79 (100%), seguido por *seh*, 10/79 (12,7%) e *sea*, 09/79 (11,4%). A PCR-*coa* revelou quatro coagulotipos (Perfil 1-4), sendo o perfil 2 (~800pb) o mais prevalente presente em 39/80 (48,75%) isolados. A ribotipagem-PCR demonstrou 3 a 7 fragmentos de 390 a 680pb, distribuídos em onze ribotipos (R1-R11). R1 e R4 foram os ribotipos mais comuns, presentes em 28,75% dos isolados estudados. Os coagulotipos e ribotipos foram distribuídos nos três setores do hospital (ambulatório, enfermaria e UTI). Estes dados revelaram um grande polimorfismo genético e demonstraram uma dispersão clonal dos *S. aureus* neste ambiente hospitalar.

Palavras-chave: *Staphylococcus aureus*, exotoxinas, ribotipagem, coagulase, saúde pública.



---

ANDRADE, Mariana de Azevedo. **Molecular typing and research of toxigenic genes in *Staphylococcus aureus* isolated from clinical samples.** 2008. Dissertation (Master of Public Health) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2008.

---

### ABSTRACT

Staphylococci are opportunistic bacteria, vastly distributed in nature, and they are part of the normal microbiota of the skin and mucosal tissues of mammals and birds. *Staphylococcus aureus* is the most important human pathogen among the staphylococci and has the capacity to cause severe infections of community and hospital origin. Besides infections of the skin, *S. aureus* can cause food poisoning by producing enterotoxins (SEs), scalded skin syndrome caused by the production of exfoliative toxins (ETA and ETB), and toxic shock syndrome caused by toxic shock syndrome toxin 1 (TSST-1). We studied eighty clinical isolates of *S. aureus* from various sources of infections and different sectors of a public hospital in the city of Recife, PE. PCR (Polymerase Chain Reaction) was used for the detection of the genes of staphylococcal toxins, and a variation of PCR, multiplex PCR, allowed in the same reaction the detection of various genes responsible for exotoxins, contributing to the epidemiologic study of these bacteria and their involvement in human infections. Also investigated was the diversity of the *S. aureus* strains and their distribution in the hospital environment, by analyzing the polymorphism of the 3' terminal region of the coagulase gene (*coa* PCR) and 16S-23S intergenic region of the ribosomal operons (PCR-ribotyping). The genotypes of toxigenic genes found among the *S. aureus* isolates were *seg* singly or *seg* in the combinations *seg* + *sec*, *seg* + *sea*, *seg* + *seb*, *seg* + *tst*, *seg* + *eta*, *seg* + *seh*, *seg* + *sec* + *tst*, *seg* + *sea* + *seh*, and *seg* + *sea* + *seb* + *seh*. The most frequent gene was *seg*, present in all the positive specimens, 79/79 (100%), followed by *she*, 10/79 (12.7%) and *sea*, 9/79 (11.4%). *coa* PCR revealed four coagulotypes (profiles 1-4), where the most prevalent, profile 2 (~800 bp), was found in 39/80 (48.75%). PCR-ribotyping demonstrated 3 to 7 fragments of 390 to 680 bp, distributed among eleven ribotypes (R1-R11). R1 and R4 were the most common ribotypes, present in 28.75% of the strains studied. The coagulotypes and ribotypes were distributed in the three sectors of the hospital (outpatient clinic, wards and ICU). These findings reveal a great genetic polymorphism and demonstrate a clonal dispersion of *S. aureus* in this hospital environment.

Key words: *Staphylococcus aureus*, exotoxins, ribotyping, coagulase, public health.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Microrganismos pertencentes ao gênero <i>Staphylococcus</i> spp. Característica morfotintorial pela técnica de coloração de Gram.....	17
Figura 2	Micrografia eletrônica de <i>S. aureus</i> .....	18
Figura 3	Impetigo: lesão cutânea localizada.....	19
Figura 4	Furúnculo estafilocócico.....	20
Figura 5	Colônias de <i>S. aureus</i> em meio de agar sangue de carneiro (produção de hemolisinas).....	22
Figura 6	Prova da coagulase em tubo, observando-se a formação de coágulo.....	23
Figura 7	Representação da prova da catalase em cultura de <i>S. aureus</i> .....	24
Figura 8	Representação da prova de DNase positiva, observando-se ao redor do inóculo uma alteração na cor do meio de cultura.....	24
Figura 9	Meio de agar sais-manitol semeado com <i>S. aureus</i> .....	24
Figura 10	Representação da sensibilidade de <i>S. aureus</i> à novobiocina, observando-se um halo de inibição do microrganismo ao redor do disco de antibiótico.....	25
Figura 11	Representação da ligação de um superantígeno estafilocócico a uma molécula de MHC de classe II e a um receptor de célula T.....	28
Figura 12	Síndrome Estafilocócica da Pele Escaldada em Recém-Nascido.....	31
Figura 13	Eritrodermia (rash) em Paciente com Síndrome do Choque Tóxico ....	32
Figura 14	Esquema das etapas da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	35
Figura 15	Esquema da região da seqüência repetitiva do gene da coagulase ( <i>coa</i> ).....	38
Figura 16	Esquema representativo da região polimórfica espaçadora intergênica (ITS) 16S-23S de um operon ribossomal, mostrando localização do pareamento dos <i>primers</i> 1 e 2.....	39
Figura 17	Distribuição dos isolados de <i>S. aureus</i> nos setores do hospital público de Recife-PE.....	44
Figura 18	Freqüências dos genes <i>sea</i> , <i>seb</i> , <i>sec</i> , <i>seg</i> , <i>seh</i> , <i>eta</i> e <i>tst</i> nos isolados de <i>S. aureus</i> .....	51
Figura 19	Gel representativo dos produtos de amplificação da PCR dos genes <i>sea</i> , <i>seb</i> , <i>sec</i> , <i>seg</i> , <i>seh</i> , <i>tst</i> e <i>eta</i> nos isolados de <i>S. aureus</i> .....	52

Figura 20	Sítios mais freqüentes de infecção por <i>S. aureus</i> e os genes das exotoxinas relacionados.....	55
Figura 21	Perfis eletroforéticos representativos dos produtos de PCR do gene <i>coa</i> de 80 isolados clínicos de <i>S. aureus</i> em um hospital público do Recife-PE.....	61
Figura 22	Sítios mais freqüentes de infecção por <i>S. aureus</i> e os coagulotipos relacionados.....	64
Figura 23	Perfis eletroforéticos representativos da ribotipagem-PCR de 80 isolados de <i>S. aureus</i> oriundos de amostras clínicas.....	66
Figura 24	Freqüências dos perfis eletroforéticos representativos da ribotipagem-PCR.....	67
Figura 25	Sítios mais freqüentes de infecção por <i>S. aureus</i> e os ribotipos relacionados.....	70

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Características dos isolados de <i>S. aureus</i> estudados.....	45
Tabela 2	Seqüências de <i>primers</i> usados na análise da PCR para a detecção dos genes <i>sea-see</i> , <i>seg</i> , <i>seh</i> , <i>tst</i> , <i>eta</i> e <i>etb</i> em isolados de <i>S. aureus</i> , oriundos de amostras clínicas, de um hospital público de Recife-PE.....	49
Tabela 3	Distribuição dos genes das exotoxinas positivas pela PCR nos <i>S. aureus</i> isolados nos diferentes setores do hospital.....	53
Tabela 4	Genótipos observados nos isolados de <i>S. aureus</i> .....	54
Tabela 5	Genes das exotoxinas, sítios de infecção e distribuição dos <i>S. aureus</i> no hospital.....	56
Tabela 6	Resultados da PCR do gene <i>coa</i> de <i>S. aureus</i> isolados de amostras clínicas em um hospital público do Recife-PE.....	62
Tabela 7	Ribotipos, sítios de infecção e distribuição do <i>S. aureus</i> no hospital.....	68
Tabela 8	Coagulotipos e ribotipos relacionados em <i>S. aureus</i> .....	72
Tabela 9	Coagulotipos e genes toxigênicos relacionados em <i>S. aureus</i> .....	74
Tabela 10	Exotoxinas, coagulotipos, ribotipos, sítios de infecção e distribuição do <i>S. aureus</i> no hospital.....	75

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	American Type Culture Collection
BHI	Brain Heart Infusion
CDC	Centro de Controle e Prevenção de Doenças
<i>coa</i>	Gene da coagulase
CPqAM	Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães
CRF	Fator de reação com a coagulase
DNA	Ácido desorribonucléico
DNase	Desoxirribonuclease
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfato
<i>egc</i>	<i>Enterotoxin gene cluster</i> - Grupo gênico de enterotoxinas
ETA-ETD	Toxinas esfoliativas dos tipos A, B, C e D
FRI	Food Research Institute
GC	Guanina + Citosina
HC	Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco
ITS	Região espaçadora intergênica
KCl	Cloreto de Potássio
KDa	KiloDalton
MHC	Complexo de histocompatibilidade principal
mM	Milimolar
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> meticilina resistente
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ORF	<i>Open Reading Frame</i> - quadro aberto de leitura
ORSA	<i>Staphylococcus aureus</i> oxacilina resistente
pb	Pares de bases
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
<i>Primer</i>	Oligonucleotídeo iniciador
PT	Toxinas pirogênicas
RAPD	Polimorfismo do DNA Amplificado Aleatoriamente
rDNA	DNA ribossomal
RNA	Ácido ribonucléico
rRNA	RNA ribossomal
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SEA-SEE	Enterotoxinas Estafilocócicas dos tipos A, B, C, D e E
<i>sea-see</i>	Gene das enterotoxinas dos tipos A, B, C, D e E
SEG-SER e	Enterotoxinas Estafilocócicas dos tipos G-R e U
SEU	
<i>seg-ser e seu</i>	Gene das enterotoxinas dos tipos G-R e U
SEs	Enterotoxinas Estafilocócicas
<i>spa</i>	Gene da proteína A estafilocócica
SPE	Exotoxinas pirogênicas estreptocócicas
SSRs	Seqüência de Pequenas Repetições em Tandem
Tris-HCl	Aminometano-ácido clorídrico
tRNA	RNA transportador
TSS	Síndrome do Choque Tóxico
TSST-1	Toxina da Síndrome do Choque Tóxico tipo 1
<i>tst</i>	Gene da toxina 1 da Síndrome do Choque Tóxico

UFC	Unidade Formadora de Colônia
UTI	Unidade de Tratamento Intensivo
UV	Ultra violeta
VISA	<i>Staphylococcus aureus</i> com sensibilidade reduzida a vancomicina

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	15
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b>	17
2.1 O gênero <i>Staphylococcus</i>	17
2.2 <i>Staphylococcus aureus</i>	18
2.3 A patogenicidade de <i>S. aureus</i>	20
2.4 Diagnóstico laboratorial de <i>S. aureus</i>	22
2.5 Intoxicação alimentar estafilocócica	25
2.6 Enterotoxinas estafilocócicas (SÉS)	27
2.6.1 Aspectos genéticos das enterotoxinas	29
2.7 Síndrome estafilocócica da pele escaldada	31
2.8 Síndrome do choque tóxico estafilocócico	32
2.9 Reação em cadeia da polimerase (PCR)	33
2.10 Tipagem molecular de <i>S. aureus</i>	36
2.11 Polimorfismo do gene da coagulase em <i>S. aureus</i>	37
2.12 A técnica da ribotipagem-PCR	38
<b>3 JUSTIFICATIVA</b>	40
<b>4 PERGUNTA CONDUTORA</b>	41
<b>5 HIPÓTESE</b>	42
<b>6 OBJETIVOS</b>	43
6.1 Objetivo Geral	43
6.2 Objetivos Específicos	43
<b>7 MATERIAL E MÉTODOS</b>	44
7.1 Amostras de <i>S. aureus</i> estudadas	44
7.2 Extração do DNA genômico	47
7.3 Investigação dos genes responsáveis pelas exotoxinas em <i>S. aureus</i>	48

<b>7.4 Pesquisa do gene da coagulase (<i>coa</i>) em <i>S. aureus</i></b>	50
<b>7.5 Ribotipagem-PCR</b>	50
<b>8 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	51
<b>8.1 Pesquisa das exotoxinas em <i>S. aureus</i>, isolados de amostras clínicas diversas, em diferentes setores de um hospital público de Recife-PE</b>	51
<b>8.2 Tipagem molecular dos <i>S. aureus</i> isolados de amostras clínicas, através polimorfismo do gene da coagulase (<i>coa</i>)</b>	60
<b>8.3 Tipagem molecular dos isolados clínicos de <i>S. aureus</i> pela ribotipagem-PCR</b>	65
<b>8.4 Correlação entre a ribotipagem-PCR e polimorfismo do gene da coagulase (<i>coa</i>) em <i>S. aureus</i></b>	71
<b>8.5 Correlação entre os genes toxigênicos e a produção da coagulase em <i>S. aureus</i></b>	73
<b>9 CONCLUSÕES</b>	78
<b>REFERÊNCIAS</b>	79
<b>APÊNDICE</b>	97
APÊNDICE A - Artigo Científico	97
<b>ANEXOS</b>	123
ANEXO A - Parecer do CEP/CPqAM	123
ANEXO B - Declaração do CEP/CPqAM	124



## 1 INTRODUÇÃO

*Staphylococcus aureus* permanece como um dos patógenos mais comuns em infecções sistêmicas de origem comunitária e hospitalar. Diversos estudos epidemiológicos, incluindo a Vigilância Nacional de Infecções Nosocomiais dos Estados Unidos, mostraram que a incidência de infecções por *S. aureus* vem aumentando consideravelmente nas últimas décadas em todas as faixas etárias, incluindo recém-nascidos (LADHANI et al., 1999).

*S. aureus* assume relevância para a saúde pública, pois pode produzir enterotoxinas, sendo frequentemente envolvido em intoxicações alimentares (FREITAS et al., 2004; FISHER et al., 2007), além de causar outras doenças como a Síndrome da Pele Escaldada (LADHANI et al., 1999) e a Síndrome do Choque Tóxico (TSS) (DINGES; ORWIN; SCHLIEVERT, 2000).

A detecção de toxinas estafilocócicas é realizada, principalmente, através de testes sorológicos. Porém, a caracterização sorológica das enterotoxinas pode ser dificultada por causa dos baixos níveis de produção destas toxinas, dificuldades associadas com a purificação e a falta de métodos simples e rápidos para suas detecções, além do tempo dispensado para realização dessas técnicas (SU; WONG, 1995).

Diante da publicação das seqüências de DNA das exotoxinas, a técnica da PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) tornou-se um método útil na detecção dos genes responsáveis por estas toxinas, apresentando-se como um método sensível, rápido e preciso (BECKER; ROTH; PETERS, 1998). Uma variação da mesma, a PCR-multiplex permite que numa mesma reação sejam detectados vários genes responsáveis pelas exotoxinas, contribuindo para o estudo da epidemiologia das bactérias mencionadas e seu envolvimento em infecções humanas (BECKER ROTH; PETERS, 1998; SALASIA et al., 2004).

O conhecimento da cadeia epidemiológica de qualquer enfermidade é um passo fundamental para que sejam aplicadas medidas ideais de profilaxia e controle de uma doença (AMARAL, 1999). Para identificação e comparação de isolados de *S. aureus* em estudos epidemiológicos, várias técnicas moleculares foram desenvolvidas e utilizadas (AARESTRUP; DANGLE; SORDILLO, 1995; PEREIRA et al., 2002; ZADOKS et al., 2002; VAUTOR et al., 2003).

A análise do gene da coagulase (*coa*) pela PCR permite subdividir as amostras de *S. aureus* baseado no polimorfismo do gene *coa*, utilizando iniciadores específicos que geram fragmentos de diferentes tamanhos dependendo da amostra analisada (VIEIRA-DA-MOTA;

FOLLY; SAKYIAMA, 2001). 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 da coagulase, o que possibilita uma tipagem molecular com base nesse polimorfismo (GOH et al., 1992).

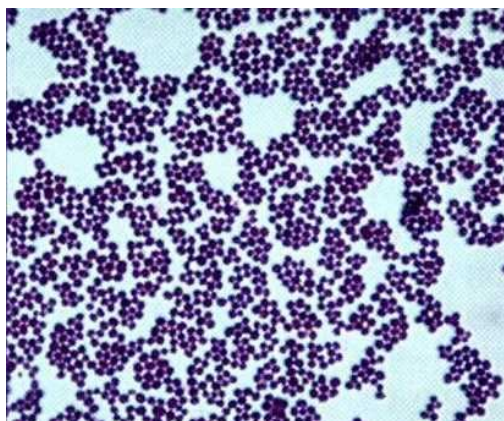
Em alguns procariotos os genes que codificam o RNA ribossomal formam operons dispostos em ordem e separados por regiões espaçadoras, que apresentam um grau de variação na seqüência que pode ser utilizado para discriminar clones e linhagens clonais (GÜRTLER; BARRIE, 1995; PEREIRA et al., 2002). O método de tipagem, denominado ribotipagem-PCR, tem-se mostrado de alto valor taxonômico e epidemiológico (TANG et al., 1997). Essa técnica constitui valiosa ferramenta para identificar e diferenciar isolados do gênero estafilococos de origem humana e animal, sendo útil para epidemiologia molecular (BES et al., 2002; OLIVEIRA; RAMOS, 2002; PEREIRA et al., 2002; DAKIC et al., 2005; SHITTU et al., 2006). Além disso, a utilização de mais de uma técnica molecular muitas vezes é necessária para aumentar a eficiência e o poder discriminatório entre os isolados bacterianos (TENOVER et al., 1994).

Dessa forma, este trabalho objetivou realizar um estudo epidemiológico-molecular em *S. aureus*, isolados de amostras clínicas, em um hospital público do Recife/PE para compreender melhor os mecanismos de patogenicidade destes microrganismos no homem e verificar a sua dispersão no ambiente hospitalar.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 O gênero *Staphylococcus*

De acordo com *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, o gênero *Staphylococcus* (do grego “*staphyle*” = cacho de uvas e “*coccus*” = semente ou grão) pertence à família Micrococcaceae (KONEMAN et al., 2001). Apresentam-se em forma de cocos Gram-positivos, com 0,5 a 1,5  $\mu\text{m}$  de diâmetro, formando cachos devido à sua divisão ocorrer de maneira aleatória e em vários planos (Figura 1). São imóveis, não esporuladas e suas colônias são relativamente grandes, com 1 a 2 mm de diâmetro. As colônias são opacas, convexas, cremosas e suas cores variam do branco a vários tons de amarelo, dependendo da espécie. Em meio de Agar Sangue, algumas cepas produzem  $\beta$ -hemólise (KONEMAN et al., 2001).



**Figura 1.** Microrganismos pertencentes ao gênero *Staphylococcus* spp. Característica morfológica pela técnica de coloração de Gram.  
Fonte: Tortora, Funke e Case (2005).

As bactérias pertencentes a este gênero são catalase e termonuclease positivas, coagulase positivas ou negativas dependendo da espécie (KLOSS; LAMBE, 1991). Somente as espécies *S. aureus*, *S. delphini*, *S. intermedius*, *S. schleiferi coagulans* e algumas cepas de *S. hyicus* são coagulase positiva. A maioria das espécies de *Staphylococcus* é coagulase negativa (BAIRD-PARKER, 1990). As bactérias pertencentes ao gênero *Staphylococcus* são sensíveis à ação da lisostafina, característica esta que permite a sua diferenciação do gênero *Micrococcus* (TRABULSI et al., 2002). Diferem também dos *Micrococcus* spp. por serem oxidase-negativa, fermentarem glicose em anaerobiose, possuírem ácido teicóico como

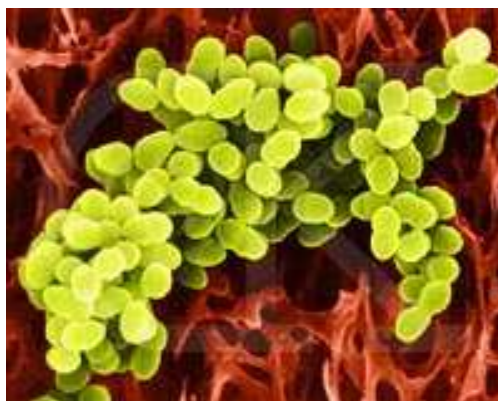
constituente de sua parede celular e DNA com conteúdo bastante reduzido de GC (30 a 39%) (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 1997; RAVEL, 1997).

Os estafilococos são mesófilos, apresentando temperatura de crescimento na faixa de 4°C a 46°C, sendo a temperatura ótima de 35°C a 37°C e são tolerantes a concentrações de 10% a 20% de cloreto de sódio (FRAZIER; WESHOFF, 2000). Apresentam capacidade 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).

O gênero *Staphylococcus* abrange cerca de 42 espécies diferentes (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, 2006), sendo 20 associadas a uma ampla variedade de infecções de caráter oportunista, em seres humanos e animais (KONEMAN et al., 2001). Em patologias humanas, as principais espécies envolvidas são: *S. aureus*, *S. epidermidis* e *S. saprophyticus* (TRABULSI et al., 2002).

## 2.2 *Staphylococcus aureus*

*S. aureus* (Figura 2) é o patógeno humano mais importante entre os estafilococos. É encontrado no ambiente externo e em narinas anteriores de 20-40% dos adultos, enquanto que 60% dos humanos podem ser colonizados temporariamente (BANIA et al., 2006). Outros sítios de colonização incluem pregas cutâneas, períneo, axilas e vagina (KONEMAN et al., 2001).



**Figura 2.** Micrografia eletrônica de *S. aureus*.  
Fonte: Kimicontrol (2008).

Este patógeno representa a espécie geralmente envolvida em infecções humanas, tanto de origem comunitária quanto hospitalar, sendo, conseqüentemente, a mais extensivamente

estudada. *S. aureus* é responsável por uma imensa quantidade de problemas médicos, incluindo infecções de pele e tecidos moles, infecções de sítios cirúrgicos, endocardites e bacteremias adquiridas em hospitais. Um grande número de infecções já foi relatado por conta do desenvolvimento de procedimentos médicos, incluindo o uso de próteses, imunossupressores e cateteres (CASEY; LAMBERT; ELLIOTT, 2007).

São patógenos oportunistas e a maioria das cepas produz hemolisinas, que são enzimas que lisam as hemácias. São desoxirribonuclease (DNase) e nuclease termoestável positivos, novobiocina sensíveis e fermentam manitol. Comumente encontrados nas fossas nasais, garganta, intestino, pele humana e em mucosas, tais como bucal, nasal e auricular. As infecções estafilocócicas podem ser causadas por bactérias do próprio indivíduo, de outros doentes ou de portadores saudáveis; ocorre por contato direto ou indireto e pode ocasionar foliculite, furunculose, carbunculose e impetigo (Figura 3), quando na pele (KONEMAN et al., 2001; TRABULSI et al., 2002; BERNARDO et al., 2005).



**Figura 3.** Impetigo: lesão cutânea localizada.  
Fonte: Santos-Filho (2003).

A foliculite é a infecção de um folículo piloso, que surge em decorrência de sua obstrução. O furúnculo (Figura 4), ou abscesso, é a infecção dos folículos pilosos ou glândulas sebáceas obstruídas, com envolvimento do tecido celular subcutâneo. Quando o furúnculo apresenta vários sítios de drenagem, recebe a designação de carbúnculo estafilocócico, particularmente quando localizado na nuca ou parte superior das costas (MIMS et al., 1999; TRABULSI et al., 2002).



**Figura 4.** Furúnculo estafilocócico.  
Fonte: Portal São Francisco (2008).

Em indivíduos debilitados por doenças crônicas, traumas físicos, queimaduras ou imunossupressão, *S. aureus* pode causar infecções mais graves. No caso de infecções mais profundas destacam-se a osteomielite, bacteremia, endocardite, pneumonia, meningite e artrite bacteriana (TRABULSI et al., 2002; SPICER, 2002).

### 2.3 A patogenicidade de *S. aureus*

A patogenicidade do *S. aureus* é multifatorial e geralmente envolve um grande número de proteínas extracelulares, como a produção de citotoxinas e exoenzimas (VOJTOV; ROSS; NOVICK, 2002). Algumas cepas produzem uma série de toxinas extracelulares e fatores de virulência que contribuem para a patogenicidade do microrganismo, garantindo o sucesso na sua instalação, desenvolvimento e manutenção no tecido hospedeiro (AKINEDEN et al., 2001; DEGO; VAN DIJK; NEDERBRAGT, 2002; PALMQVIST et al., 2002; STEVENS et al., 2007).

*S. aureus* pode produzir diversas toxinas, que são comumente substâncias de origem protéica, produzidas por alguns microrganismos e que contribuem para sua patogenicidade. São classificadas em exo e endotoxinas, sendo as exotoxinas bacterianas as toxinas biológicas mais potentes que se conhece (KONEMAN et al., 2001).

As exotoxinas são proteínas ou enzimas produzidas no interior de algumas bactérias Gram-positivas e liberadas na corrente sanguínea. São decorrentes da multiplicação e metabolismo dos microrganismos. 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 na 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, 2005).

As principais exotoxinas produzidas pelos estafilococos são as enterotoxinas (SEs), responsáveis pela intoxicação alimentar estafilocócica no homem, sorologicamente identificadas como SEA, SEB, SEC1-3, SED, SEE, SEG, SEH, SEI, SEJ (CARMO et al., 2002), SEK (ORWIN et al., 2001) e, recentemente SEL (ORWIN et al., 2003), SEM, SEN, SEO (LOIR; BARON; GAUTIER, 2003) e SEU (LETERTRE et al., 2003); a toxina-1 da síndrome do choque tóxico (TSST-1), responsável pela Síndrome do Choque Tóxico (BERGDOLL et al., 1981) e as Toxinas Esfoliativas, responsáveis pela Síndrome Estafilocócica da Pele Escaldada, dos tipos A (ETA), B (ETB) (LEE et al., 1987), C (ETC) (SATO et al., 1994) e D (ETD) (YAMAGUCHI et al., 2002).

A interação do microrganismo com o hospedeiro é fortemente dependente das propriedades de sua superfície celular, especificamente da presença de exopolissacarídeos na sua camada mais externa, que parece desenvolver um importante papel na virulência. Algumas cepas de *S. aureus* são capazes de produzir essas camadas de exopolissacarídeo ou biofilme (CHRISTENSEN et al., 1990; CUCARELLA et al., 2001; ARSLAN; ÖZKARDES, 2007) que deve impedir a interação entre opsonização e fagocitose (WILKINSON, 1983), além de reduzir a suscetibilidade a antibióticos, aumentando significativamente a capacidade de colonização destas cepas (BASELGA et al., 1993).

Esta bactéria pode ocasionar doenças com manifestações clínicas ou ser assintomática, originando os portadores assintomáticos quando presente no organismo hospedeiro, não causando lesões aparentes (CAVALCANTI et al., 2006). A transmissão pode acontecer por contato direto ou indireto, o que possibilita a contaminação do paciente através dos profissionais de saúde, que dão assistência a outros hospitalizados portadores, ou no manuseio de objetos contaminados (ELLIOT et al., 2002; TAMMELIN et al., 2003). O portador da bactéria tem papel essencial na epidemiologia e patogênese da infecção, aparecendo como importante fator de risco nas infecções hospitalares, já que a maioria destas infecções é proveniente de fontes exógenas (VANDENBERGH; VERBRUGH, 1999; PERL et al., 2002).

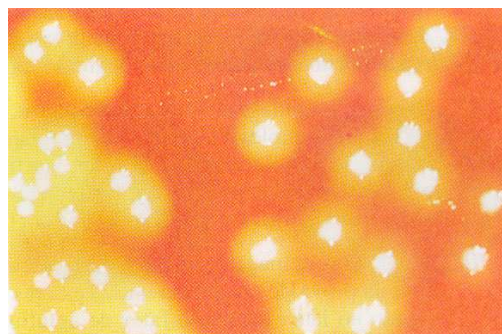
Amostras de *S. aureus* multiresistentes são mais comuns em ambiente hospitalar. Na década de 40 a penicilina era a droga de escolha em infecções estafilocócicas, porém a resistência a essa droga foi relatada pouco tempo depois. Em 1959, iniciou-se o emprego de

metecilina e outras penicilinas semi-sintéticas, tais como oxacilina, resistentes à ação de penicilinas. Contudo, já em 1960 surgiu o primeiro caso de MRSA na Europa. Os termos MRSA/ORSA referem-se a cepas resistentes a metecilina/oxacilina e VISA, as que possuem sensibilidade reduzida a vancomicina. Desde então, tornou-se líder de infecções nosocomiais e endêmico em hospitais dos Estados Unidos (TRABULSI et al., 2002; RIBEIRO; BOYCE; ZANCANARO, 2005). No Brasil, *S. aureus* mostra-se resistente a amoxicilina, ampicilina e penicilina G em 70% das cepas isoladas, restringindo o uso desses antimicrobianos para infecções estafilocócicas (TAVARES, 2000).

Estas bactérias encontram-se na ponte entre o comensalismo e a patogenicidade, portanto desenvolveram interessantes estratégias para enfrentarem inúmeras condições adversas. Formação de biofilme, aquisição de resistência a antibióticos diversos, bem como a enorme flexibilidade do genoma estafilocócico, são pré-requisitos para a sobrevivência em ambientes específicos. Estas são as principais razões pelas quais os estafilococos tornaram-se importantes patógenos nas infecções (BECKER et al., 2007).

#### 2.4 Diagnóstico laboratorial de *S. aureus*

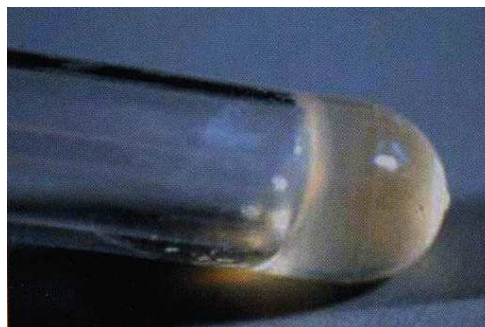
Isolados de *S. aureus* são classificados através de vários testes bioquímicos, porém muitos deles encontram-se ultrapassados pela baixa especificidade e sensibilidade. O teste para a produção de hemólise e pigmentação em placas de agar sangue (Figura 5), por exemplo, representa uma prática simples e rápida, porém, segundo Boerlin et al. (2003), não muito segura, pois existem isolados de *S. aureus* sem capacidade hemolítica e com pigmentação variável.



**Figura 5.** Colônias de *S. aureus* em meio de agar sangue de carneiro (produção de hemolisinas).  
Fonte: Koneman et al. (2001).



Por muito tempo, o único teste utilizado para identificação de *S. aureus* era a produção de coagulase em tubo (Figura 6). Sabe-se que este teste está sujeito a muitas variações de acordo com o tempo de incubação, origem do plasma utilizado ou grau de coagulação (BERKE; TILTON, 1986).



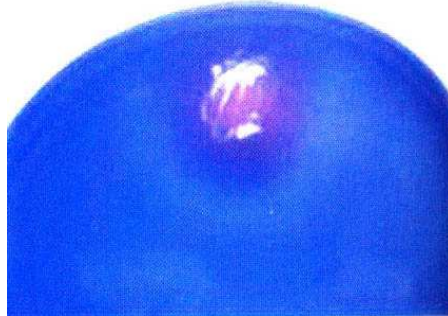
**Figura 6.** Prova da coagulase em tubo, observando-se a formação de coágulo.  
Fonte: Santos-Filho (2003).

Um método alternativo, o teste da termonuclease, detecta a produção de nucleases termoestáveis. Nucleases em geral têm a função de hidrolisar o DNA para produzir oligonucleotídeos e nucleotídeos (CHEESBROUGH, 2000). Em 1972, Lachica, Hoeprice e Riemann descreveram que *S. aureus* são capazes de produzir nucleases termorresistentes, uma propriedade, até então, não identificada em outros microrganismos. Estudos de Madison, Baselski (1983) sugerem a produção desta enzima como uma importante característica para identificação de *S. aureus*.

Muitos outros testes bioquímicos, porém, são utilizados rotineiramente para identificação de *S. aureus* nos laboratórios clínicos (SCHLEIFER, 1986) tais como produção de catalase que converte o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) em água e oxigênio gasoso (Figura 7), produção de desoxirribonuclease (DNase) que hidrolisa ácido nucléico (Figura 8), fermentação de manitol (Figura 9), sensibilidade ao antibiótico novobiocina (Figura 10), entre outros (KONEMAN, et al., 2001).



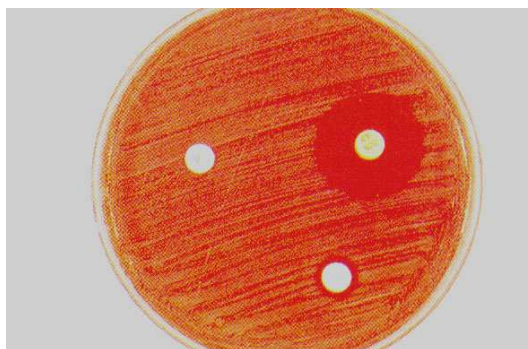
**Figura 7.** Representação da prova da catalase em cultura de *S. aureus*.  
Fonte: Santos-Filho (2003).



**Figura 8.** Representação da prova de DNase positiva, observando-se ao redor do inóculo uma alteração na cor do meio de cultura.  
Fonte: Santos-Filho (2003).



**Figura 9.** Meio agar sais-manitol semeado com *S. aureus*.  
Fonte: Kent State University (2008).



**Figura 10.** Representação da sensibilidade de *S. aureus* à novobiocina, observando-se um halo de inibição do microrganismo ao redor do disco de antibiótico.

Fonte: Santos-Filho (2003).

Nos últimos anos, o método mais seguro para identificação de espécies do gênero *Staphylococcus* consiste na utilização de sistemas comerciais de teste em miniatura, baseados em imunoenaios e testes bioquímicos, que garantem uma maior precisão na identificação de *Staphylococcus* coagulase-positivo (ROBERSON et al., 1992). Entretanto, devido ao alto custo destes *kits* e cartelas comerciais, muitos laboratórios tendem a adotar provas laboratoriais clássicas no trabalho de caracterização fenotípica dos isolados.

## 2.5 Intoxicação alimentar estafilocócica

Diferentes agentes etiológicos podem contaminar os alimentos, podendo levar a doenças, manifestadas por ação de microrganismos patogênicos ou por suas toxinas. *S. aureus* é um dos agentes patogênicos mais comuns, responsáveis por surtos de intoxicação alimentar. As peculiaridades do seu habitat tornam sua presença largamente distribuída na natureza, sendo transmitidos aos alimentos por manipuladores, na maioria, portadores assintomáticos, e pelos animais (SENA, 2000; BALABAN; RASOOLY, 2000; FREITAS et al., 2005; STAMFORD et al., 2006; SIMON; SANJEEV, 2006).

A intoxicação alimentar estafilocócica é atribuída à ingestão de toxinas produzidas e liberadas pela bactéria durante sua multiplicação no alimento, tornando-se um risco para a saúde pública. As enterotoxinas estafilocócicas são termoestáveis, podendo permanecer no alimento mesmo após o cozimento, favorecendo a ocorrência de intoxicação (ALCARAZ et al., 1997; MIMS et al., 1999; FREITAS et al., 2005; STAMFORD et al., 2006). A termoestabilidade e a relativamente alta resistência à proteólise das enterotoxinas, sugere que

elas suportam tanto o tratamento térmico do alimento, quanto à digestão no estômago. A ingestão de alimentos contendo enterotoxinas provoca vômitos em humanos, acompanhado de gastroenterite (BANIA et al., 2006).

A intoxicação alimentar estafilocócica é caracterizada clinicamente por náuseas, vômito, mal-estar, debilidade geral, diarreia aquosa não sanguinolenta e dor abdominal. Pode resultar em desidratação decorrente da perda significativa de líquido, sudorese e cefaléia, geralmente não acompanhada de estado febril (MURRAY et al. 1992). O período de incubação da doença pode variar de 30 minutos até 8 horas, porém, na maioria dos casos, os sintomas aparecem entre 2 e 4 horas após a ingestão do alimento contaminado (RODRIGUES et al. 2004). Os sintomas variam de acordo com o 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 por doenças crônicas imunossupressoras (CLIVER, 1994). O restabelecimento ocorre geralmente em período de um a dois dias (BERGDOLL, 1989).

A ingestão de alimentos contendo uma ou mais enterotoxinas pode causar a gastroenterite estafilocócica. Estima-se que de 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  $10^5$  UFC/g por alimento (MOSSSEL; GARCIA, 1975). Porém, Carmo, Bergdoll (1990) e Cunha-Neto (1999) detectaram enterotoxinas estafilocócicas em alimentos com níveis de contaminação estafilocócica entre  $10^4$  a  $10^8$  UFC/g e  $10^2$  a  $10^4$  UFC/g, respectivamente.

O homem pode atuar como reservatório dos estafilococos, tornando-se importante fonte de contaminação para os alimentos (RAPINI et al., 2004). De acordo com Cunha-Neto, Silva e Stamford (2002), *S. aureus* é o agente responsável por aproximadamente 45% das toxinfecções no mundo. Vários trabalhos referem os manipuladores de alimentos como os maiores responsáveis pela sua transmissão. Giletto, Fyffe (1998) relataram que as intoxicações alimentares estafilocócicas atingem 1,2 milhões de pessoas ao ano no mundo, ocasionando uma perda econômica nos Estados Unidos de 1,5 bilhões de dólares.

A notificação da intoxicação alimentar estafilocócica não é considerada compulsória no Brasil e em diversos países, portanto desconhece-se a verdadeira incidência devido à sintomatologia branda e de curta duração, uma vez que apenas grandes surtos chegam ao conhecimento das autoridades sanitárias (FRAZIER; WESHOFF, 2000).

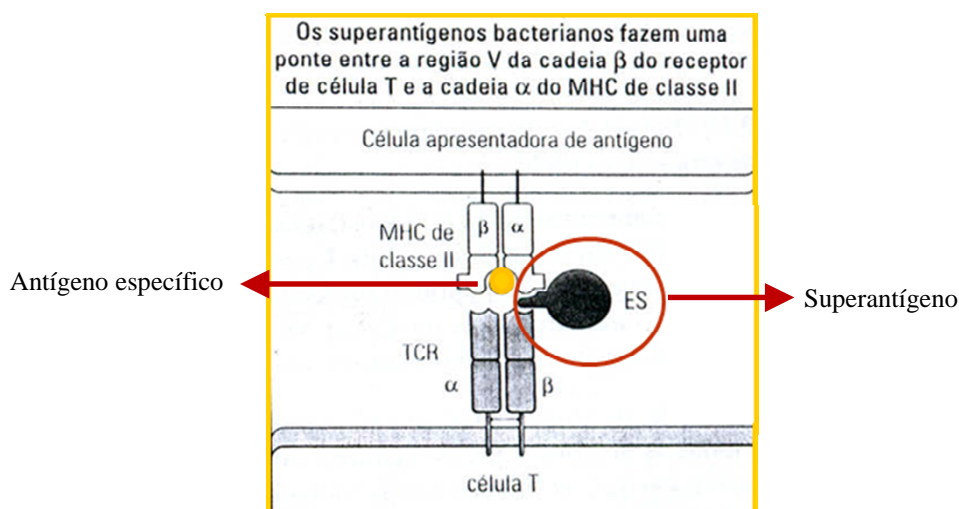
Em investigações realizadas pelos laboratórios de saúde pública do Estado de São Paulo, entre 1994 e 1998, em surtos de Enfermidades Transmitidas por Alimentos (ETAs), Gelli et al. (1999) demonstraram que o *S. aureus* foi o microrganismo prevalente.

De acordo com uma pesquisa realizada por Simon, Sanjeev (2006), dos 168 produtos alimentícios de pesca e das 87 amostras de trabalhadores de fábricas de produtos de pesca analisadas, 21 (12,5%) e 54 (62%) amostras foram positivas para *S. aureus* enterotoxigênicos, respectivamente. As enterotoxinas estafilocócicas predominantemente encontradas foram: enterotoxina C (SEC) (57%), seguida pela enterotoxina A (SEA) (43%) nos produtos de pesca, e enterotoxina B (SEB) (40%), enterotoxina C (SEC) (40%) e enterotoxina A (SEA) (20%) nos trabalhadores.

## **2.6 Enterotoxinas estafilocócicas (SEs)**

Intoxicações alimentares representam um sério problema para a saúde pública no mundo e é causada, na maioria das vezes, por alimentos contendo *S. aureus* produtores de enterotoxinas (FISCHER et al., 2007), porém outros estafilococos coagulase-positivos como *S. intermedius* e *S. hyicus*, assim como estafilococos coagulase-negativos podem ser enterotoxigênicos (VERNOZY-ROZAND et al., 1996; UDO et al., 1999).

As enterotoxinas são proteínas de cadeia simples (MARTÍN et al., 2004) e, assim como as toxinas esfoliativas e a toxina 1 da síndrome do choque tóxico, são consideradas superantígenos, por estimularem uma resposta policlonal inespecífica de células T e a liberação aumentada de citocinas, causando toxicidade sistêmica e supressão da resposta imune adaptativa, os quais prolongam a infecção bacteriana às custas da saúde do hospedeiro humano. Os superantígenos ligam-se simultaneamente as moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) de classe II e a receptores de células T, independentemente de suas especificidades de ligação a peptídeos, formando um complexo trimolecular, que induz a proliferação demasiada de células T, como demonstrado na figura 11 (PARHAM, 2001; BAKER; ACHARYA, 2004).



**Figura 11.** Representação da ligação de um superantígeno estafilocócico a uma molécula de MHC de classe II e a um receptor de célula T.

Fonte: Parham (2001).

Segundo Loir, Baron e Gautier (2003), as enterotoxinas são resistentes à hidrólise pelas enzimas gástricas e jejunais, permanecendo em atividade no trato digestivo após a ingestão. Apresentam resistência ao aquecimento à 100<sup>0</sup>C durante 30 minutos (MURRAY et al., 1992) e às temperaturas de pasteurização lenta e rápida (FRANCO; LANDGRAFF, 2000). Isto implica que as atividades biológicas das enterotoxinas estafilocócicas permanecem sem alteração, mesmo após o processamento térmico dos alimentos (HOLECKOVÁ et al., 2002).

Balaban, Rasooly (2000) descreveram que as enterotoxinas estafilocócicas pertencem à família denominada de toxinas pirogênicas (PT), originada de espécies de estafilococos e estreptococos. Também são incluídas, nesta família, a toxina 1 da síndrome do choque tóxico (TSST-1), as toxinas esfoliativas dos tipos (A e B) e as exotoxinas pirogênicas estreptocócicas (SPE) que apresentam determinadas estruturas, funções e seqüências de nucleotídeos similares. Porém, segundo Dinges, Orwin e Schlievert (2000), entre estas toxinas apenas as enterotoxinas apresentam atividade emética.

As enterotoxinas foram classificadas em cinco tipos sorológicos SEA, SEB, SEC, SED e SEE. Contudo novas enterotoxinas já foram descritas na literatura, incluindo SEG, SEH, SEI, SEJ, SEK, SEL, SEM, SEN, SEO, SEP, SEQ, SER e SEU (REN et al., 1994; SU; WONG, 1995; MUNSON et al., 1998; ZHANG; IANDOLO; STEWART, 1998; JARRAUD et al., 2001; ORWIN et al., 2001; LETERTRE et al., 2003; OMOE et al., 2003).

No Brasil, embora pequeno o número, foram realizadas investigações para se verificar a proporção de portadores de *S. aureus* no ambiente hospitalar. Iaria (1981), examinando material de vestíbulo nasal de 34 manipuladores de alimentos de três hospitais situados na

cidade de São Paulo, verificou a presença de *S. aureus* em 12 indivíduos (35,3%). Destes, dois (16,7%) revelaram-se positivos para cepas produtoras de enterotoxina estafilocócica tipo C.

Casman et al (1967) estudando 144 cepas de *S. aureus* isolados de material de fossas nasais, verificaram que 45 delas eram produtoras de enterotoxinas estafilocócicas. Observaram também que 7,6% das cepas produziam enterotoxina do tipo A, 1,4% do B, 2,8% do C, 7,6% do D, 1,4% dos A e C, 1,4% dos A e B, 7,6% A e D e 0,7% dos A, B e C.

Diversos estudos realizados têm demonstrado variações quanto à ocorrência de cepas de *S. aureus* produtoras de enterotoxinas, isoladas de alimentos, de portadores e de indivíduos com infecção estafilocócica (BECKER et al., 2003; BANIA et al., 2006; EL-HUNEIDI; BDOUR; MAHASNEH, 2006).

### 2.6.1 Aspectos genéticos das enterotoxinas

Foram estudados diferentes genes que codificam as enterotoxinas, suas denominações iniciam com as letras *se* (enterotoxina estafilocócica) ou *ent* (enterotoxina), das quais a primeira forma é a mais utilizada atualmente. Estes genes são carregados por plasmídios - *sed* e *sej* (BAYLES; IANDOLO, 1989; ZHANG; IANDOLO; STEWART, 1998), por fagos - *sea* e *see* (BETLEY; MEKALANOS, 1985), ou pelo cromossomo - *seb*, *sec*, *seg*, *seh*, *sei*, *sek*, *sel*, *sem*, *sen*, *seo*, *sep* e *seq* (LETERTRE et al., 2003).

A detecção do gene *sea* em isolados de *S. aureus* é importante, pois a enterotoxina A é tóxica em baixas concentrações (EVENSON et al., 1988). É expressa na metade da fase exponencial da multiplicação dos estafilococos (TREMAINE; BROCKMAN; BETLEY, 1993) e o gene *sea* é composto por 771 pb, codificando uma proteína de 27,1 KDa (BETLEY; MEKALANOS, 1988). O gene *seb* consiste de 798 pb que codifica uma proteína de 31,4 KDa (JOHNS JR; KHAN, 1988).

Em 20 surtos de intoxicação alimentar no centro de Taiwan, foi detectado 39 isolados de *S. aureus* que produziam SEC; 12 SECs pertenciam ao subtipo SEC2 e 13 ao subtipo SEC3. Apenas um isolado pertencia ao subtipo SEC1 e 13 a outros subtipos de SECs, sugerindo que SEC2 e SEC3 são os subtipos de SECs mais frequentes em surtos de intoxicação alimentar (CHEN et al., 2001).

O gene *sec1* contém 801 pb e codifica uma proteína de 27,4 KDa (BOHACH; SCHLIEVERT, 1987). O gene *sec2* contém 801 pb e codifica uma proteína de 26,0 KDa (BOHACH; SCHLIEVERT, 1989). O gene *sec3* contém 798 pb e codifica uma proteína de 27,4 KDa (COUCH; BETLEY, 1989).

Casman et al. (1967), descreveram que SED é considerada a segunda enterotoxina estafilocócica mais encontrada em intoxicações alimentares, perdendo apenas para SEA. A baixa produção de SED é significativa, pois pouca quantidade desta enterotoxina (100 a 200 ng) é suficiente para 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 com peso molecular 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, mas ainda maior homologia (81%) com SEA (BALABAN; RASOOLY, 2000).

O *cluster* (*egc*) que foi identificado por Jarraud et al. (2001) compreende os genes *seg*, *sei*, *sem*, *sen* e *seo*. Os genes *seg* e *sei*, codificam proteínas de 27,0 KDa (SEG) e 24,9 KDa (SEI), ambas induzem a proliferação de células T e ação emética (MUNSON et al., 1998).

Os genes *seg* e *sei* estão presentes em *S. aureus* num mesmo fragmento de DNA de 3,2 kb, organizados em tandem (JARRAUD et al., 1999). Neste mesmo estudo foi verificado que 12 cepas de *S. aureus* isoladas de pacientes com Síndrome do Choque Tóxico Estafilocócico e Síndrome Estafilocócica da Pele Escaldada, não produziam TSST-1, SEA-SEE, ETA ou ETB. Porém, utilizando *primers* específicos para os genes *seg* e *sei*, ambos foram detectados em todas as amostras, demonstrando que SEG e SEI estão associadas com as Síndromes do Choque Tóxico e a da Pele Escaldada.

SEH é uma enterotoxina com peso molecular de 27,3 KDa (SU; WONG, 1995). Ren et al. (1994) purificaram SEH de uma cepa clínica de *S. aureus* de um paciente com TSS não menstrual que foi negativa para TSST-1. Su, Wong (1996) desenvolveram um 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 da Síndrome do Choque Tóxico.



## 2.7 Síndrome estafilocócica da pele escaldada

A Síndrome Estafilocócica da Pele Escaldada, também conhecida como “doença de Ritter” e “doença de Lyell” ou necrose tóxica epidérmica em crianças, acontece esporadicamente e em surtos (MIMS et al., 1999). Foi descrita pela primeira vez por um médico alemão chamado Baron Gotfried Ritter von Rittershain, que observou 297 casos da doença em crianças, em um período de 10 anos. Porém não conseguiu determinar a causa da enfermidade na época (LADHANI et al., 1999). Na atualidade, sabe-se que a doença é causada por determinadas cepas de estafilococos produtoras de toxinas chamadas de esfoliativas A (ETA) e B (ETB), que são proteínas de peso molecular relativo de 24 KDa cada uma. As duas moléculas são diferentes em termos bioquímicos e imunológicos, porém possuem atividades biológicas similares (KONEMAN et al., 2001).

Pode-se observar a formação de bolhas em amplas áreas corpóreas (lembrando o que ocorre quando a pele é banhada por água fervente), com posterior aparecimento de escaras nas camadas superficiais da pele, isso resulta em grandes áreas descamadas e em carne viva (Figura 12). A doença é usualmente observada em recém-nascidos e lactentes (KONEMAN et al., 2001; TRABULSI et al., 2002), de 3 a 16 dias de idade (LADHANI et al., 1999) ou em crianças de até 5 anos de idade, com desenvolvimento incompleto de anticorpos contra toxinas estafilocócicas (BLYTH; ESTELA; YOUNG, 2007), embora adultos com infecções latentes também sejam susceptíveis (LADHANI et al., 2001).



**Figura 12.** Síndrome Estafilocócica da Pele Escaldada em Recém-Nascido.

Fonte: Tortora, Funke e Case (2005).

Um novo tipo de toxina esfoliativa, denominada ETC, foi verificado a partir de cepas de *S. aureus* isoladas de infecções cutâneas de cavalo (SATO et al., 1994). Posteriormente,

Yamaguchi et al. (2002) identificaram a seqüência do gene de uma nova toxina esfoliativa, a ETD, numa ilha de patogenicidade em isolados clínicos de *S. aureus*.

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 27,0 KDa (SATO et al., 1994) e ETD 27,2 KDa (YAMAGUCHI et al., 2002). A atividade da ETA é estável, mesmo após aquecimento a 100°C por 20 minutos, o que não ocorre com ETB e ETC, que são sensíveis ao aquecimento de 60°C por 15 a 30 minutos (SATO et al., 1994). Torna-se um problema para a saúde pública a elevada termo-resistência de ETA, pois mesmo após o tratamento térmico dos alimentos, esta toxina poderia induzir afecções cutâneas no homem.

## 2.8 Síndrome do choque tóxico estafilocócico

A Síndrome do Choque Tóxico Estafilocócico (TSS) foi relatada pela primeira vez por Todd, Fishaut (1978). É uma doença caracterizada por ocasionar febre, hipotensão, vertigem ortostática, eritrodermia (rash), vômitos de intensidade variada, diarreia, insuficiência renal, cefaléia, calafrios, faringite, conjuntivite (KONEMAN et al., 2001; TRABULSI et al., 2002) e descamação da pele, principalmente nas palmas das mãos e nas solas dos pés (MIMS et al., 1999; TRABULSI et al., 2002), figura 13.



**Figura 13.** Eritrodermia (rash) em Paciente com Síndrome do Choque Tóxico.  
Fonte: Hall (1991).

Inicialmente, a doença foi observada mais freqüentemente em mulheres brancas, em idade reprodutiva, geralmente no período menstrual. Os pesquisadores dos primeiros casos verificaram uma associação entre o início da enfermidade e a utilização de tampões menstruais hiperabsorventes. Posteriormente esta síndrome foi descrita em mulheres (em

período não menstrual) e homens, em qualquer idade (REISS, 2000; KONEMAN et al., 2001), como uma complicação de abscessos estafilocócicos, osteomielite, infecções de feridas cirúrgicas e pneumonia pós-influenza (KONEMAN et al., 2001).

Pacientes com TSS não menstrual apresentam maior taxa de uso anterior de antibióticos, são mais propensos a adquirir TSS por infecções nosocomiais e tendem a desenvolver características de rash mais cedo. A maioria dos adultos tem um nível protetor de anticorpos contra TSST-1, porém as pessoas carentes desses anticorpos, colonizadas ou infectadas por *S. aureus* portador do gene *tst*, podem desenvolver a doença (REISS, 2000).

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 linhagem consiga atingir a circulação (HERZER, 2001).

A toxina-1 da síndrome do choque tóxico é reconhecida como a principal causa da Síndrome do Choque Tóxico e com menos frequência pelas enterotoxinas SEB (RAJAGOPALAN et al., 2006), SEA, SEC, SED (VOJTOV; ROSS; NOVICK, 2002), SEG e SEI (JARRAUD et al., 1999).

A TSST-1 é codificada pelo gene *tst*, que está na ilha de patogenicidade estafilocócica<sup>1</sup>, de 15 a 19 kb, presente no cromossomo bacteriano (PARSONNET, 1998; RUZIN; LINDSAY; NOVICK, 2001). Dinges, Orwin e Schlievert (2000), relataram que a proteína apresenta 22 KDa.

## 2.9 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) permite que o DNA de uma região selecionada do genoma de um organismo seja amplificado milhares de vezes, selecionando efetivamente este DNA do restante do genoma (ALBERTS et al., 2004). Portanto uma seqüência-alvo de DNA é identificada e amplificada até um ponto em que pode ser detectada (KONEMAN et al., 2001). A amplificação de regiões específicas do DNA é fundamental para diversas técnicas moleculares (COBB; CLARKSON, 1994).

Kary Mullis, no final dos anos 80, descreveu a técnica da PCR para amplificação de uma seqüência específica de DNA. As seqüências nas bordas das regiões selecionadas precisam ser conhecidas, de modo que dois oligonucleotídeos iniciadores (*primers*),

geralmente de 20pb, se associem à molécula de DNA-alvo possibilitando o início da síntese pela DNA-polimerase na região desejada (BROWN, 1999).

A PCR é realizada utilizando-se um “suporte quente” automatizado e computadorizado, denominado termociclo. São necessários para a reação: DNA de interesse, iniciador ou “*primer*” de oligonucleotídeos de cadeia simples, desoxirribonucleotídeos (dNTPs), tampão de reação, MgCl<sub>2</sub> em concentração adequada, uma DNA-polimerase termoestável “*Taq* DNA polimerase”. Estes componentes são colocados em um pequeno recipiente e depositados no termociclador (KONEMAN et al., 2001).

O recipiente contendo a amostra é submetido a uma alta temperatura, geralmente 94<sup>0</sup>C, para provocar o rompimento das pontes de hidrogênio entre ambas as cadeias de DNA, causando a desnaturação da molécula. A temperatura é diminuída a 50-65<sup>0</sup>C quando então, os *primers* têm a oportunidade de se anelarem às suas seqüências complementares no DNA genômico. Finalmente, a temperatura é colocada em torno de 72<sup>0</sup>C, temperatura ideal para que a DNA-polimerase utilizada na reação atue, dirigindo a síntese de novas cadeias (FARAH, 1997). Repetindo-se esses três tipos de passos, desnaturação, anelamento e síntese, por cerca de 30 ciclos permite-se a amplificação do DNA molde de forma exponencial, como demonstrado na figura 14 (FARAH, 1997; ZAHA et al., 2003; TORTORA; FUNKE; CASE, 2005)

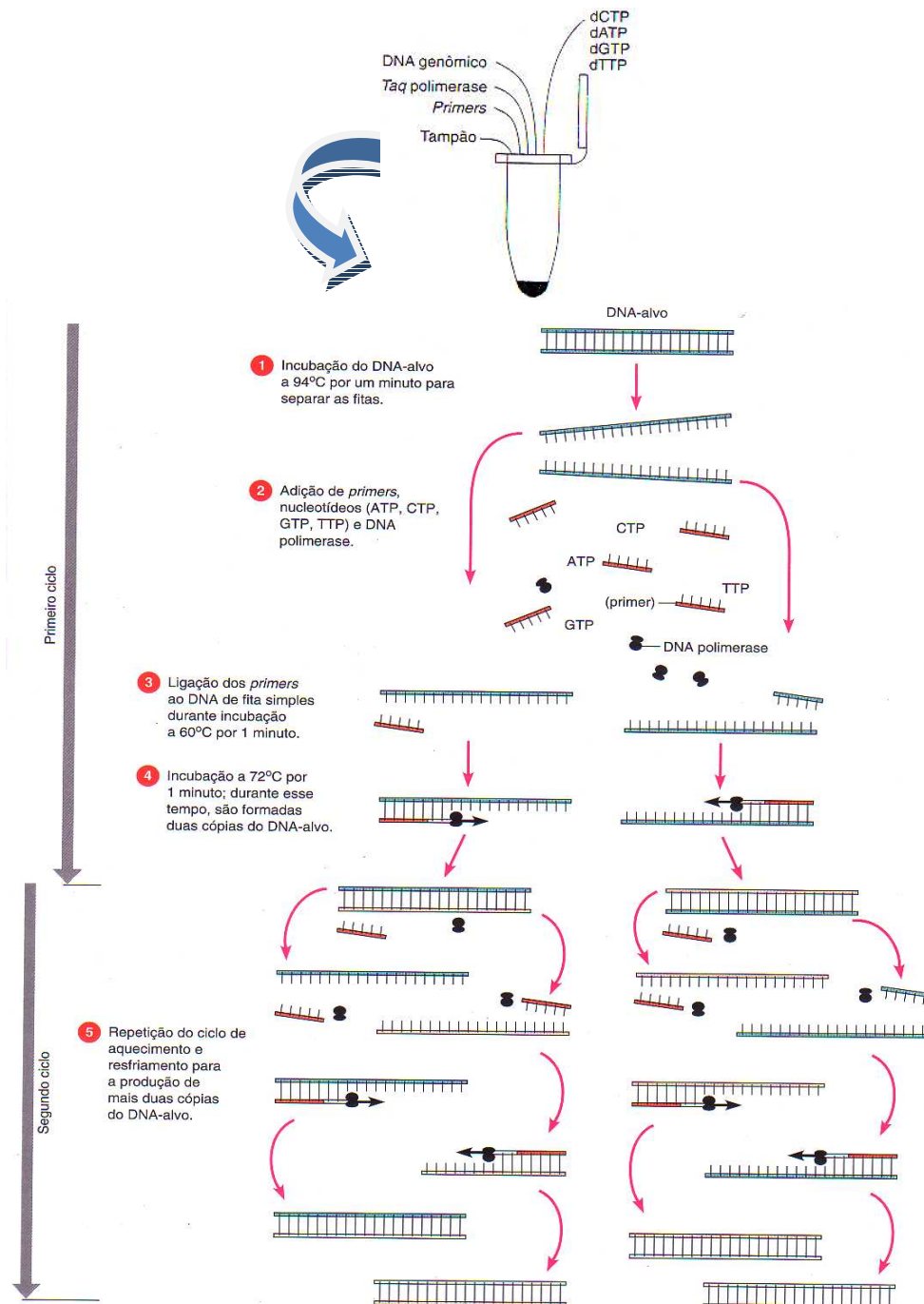
Diversas modificações da técnica da PCR básica também foram descritas. Uma dessas modificações é a PCR - multiplex. Com essa alteração, múltiplos pares de *primers* para diferentes moléculas-alvo são incluídos na mesma mistura de amplificação (KONEMAN et al., 2001). Este procedimento permite que várias seqüências de uma mesma molécula de DNA sejam lidas, ou ainda, que múltiplos fatores de virulência de um mesmo patógeno sejam pesquisados (SCHOSKE et al., 2003; MARTINEZ; TADDEI, 2004).

As SEs são rotineiramente detectadas por ELISA, imunodifusão, radioimunoensaio, aglutinação em látex, mas a exequibilidade destes métodos é usualmente limitada a testes comerciais para SEA, SEB, SEC, SED e SEE (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.

Com relação à pesquisa de genes *se*, a técnica de PCR-multiplex pode detectar vários tipos de genes toxigênicos simultaneamente. Esta versatilidade permitiu que este tipo de técnica fosse utilizada, pois permite a detecção rápida e real de cepas de *S. aureus* portadoras de genes *se* (SHARMA; RESS; DODD, 2000; ROSEC; GIGAUD, 2002; NÁJERA-

SÁNCHEZ et al., 2003; LONCAREVIC et al., 2005; JORGENSEN et al., 2005) economizando tempo e gastos com materiais.

A técnica de PCR possui diversas vantagens e as principais são: necessitar de quantidades muito pequenas de DNA, ser extremamente sensível e de simples execução, quando se tem a condição de reação padronizada, como reagentes, ciclos térmicos, amostras de DNA e pH da reação (FARAH, 1997).



**Figura 14.** Esquema das etapas da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

Fonte: Tortora, Funke e Case (2005).

## 2.10 Tipagem molecular de *S. aureus*

De acordo com Tenover et al. (1995), é importante definir, do ponto de vista epidemiológico, a origem dos organismos envolvidos na etiologia de uma doença. A adequada identificação do patógeno é um requisito indispensável para detecção do reservatório e fonte de infecção, e também para monitorar sua dispersão dentro e entre a população estudada.

Uma considerável variabilidade do conteúdo genômico foi observada em populações naturais de *S. aureus* (FITZGERALD et al., 2003; PEREIRA et al., 2002). Quando patógenos de múltiplos genótipos infectam um hospedeiro, eles competem entre si por nutrientes e na transmissão, deste modo o isolado que apresentar mais fatores de virulência será beneficiado (AARESTRUP; SCOTT; SORDILLO, 1994; SU et al., 1999). O conhecimento do perfil epidemiológico-molecular das doenças causadas por *S. aureus* poderá auxiliar na elaboração de estratégias de controle mais eficientes para a redução da infecção, uma vez que, a partir dos perfis moleculares, pode-se inferir relações genéticas entre os diferentes clones, detectar o fluxo gênico e traçar rotas de dispersão da infecção (KAPUR et al., 1995; LANGE et al., 1999; SOMMERÄUSER et al., 2003).

Segundo Struelens et al. (1992), Kapur et al. (1995) e Vautor et al. (2003), vários métodos foram utilizados para monitorar infecções bovinas e humanas causadas por *S. aureus*. Dentre esses métodos, destacam-se algumas análises bioquímicas, moleculares e ferramentas baseadas na tipagem do DNA (fagotipagem, antibiotipagem, biotipagem, eletroferotipagem de proteínas estruturais ou enzimas, perfil plasmidial e ribotipagem) que podem auxiliar no conhecimento mais detalhado sobre a dinâmica das infecções causadas por *S. aureus* (AARESTRUP; DANGLE; SORDILLO, 1995; PEREIRA et al., 2002; ZADOKS et al., 2002; SANTOS et al., 2003; VAUTOR et al., 2003).

O desenvolvimento e aplicação de técnicas moleculares iniciaram uma revolução no diagnóstico e monitoramento de doenças infecciosas. Variações da técnica de PCR são úteis para a tipagem de amostras clínicas de *S. aureus*, tais como: RAPD (*Random Amplification Polymorphism DNA*, Polimorfismo do DNA Amplificado Aleatoriamente), que amplifica regiões aleatórias do genoma do microrganismo; a associação ribotipagem-PCR, que detecta o polimorfismo nas regiões espaçadoras intergênica 16S-23S dos operons ribossomais; análise de genes polimórficos como o gene da coagulase (*coa*) e da proteína A (*spa*) (TENOVER et al., 1994).

Além disso, a utilização de mais de uma técnica para estabelecer relação entre isolados bacterianos mostra-se muitas vezes necessária, para aumentar a eficiência e o poder discriminatório das mesmas (TENOVER et al., 1994).

### 2.11 Polimorfismo do gene da coagulase em *S. aureus*

Diversas cepas de *S. aureus* produzem uma proteína extracelular, chamada coagulase (ou *staphylocoagulase*), a qual forma um complexo, de forma específica, com a protrombina (KAIDA et al., 1987). No plasma, esse complexo denominado *staphylofibrina* pode degradar o fibrinogênio em fibrina sem qualquer clivagem proteolítica da protrombina. Ainda não está muito clara a importância da coagulase como fator de virulência (SU et al., 1999), porém a coagulase foi apontada como a primeira linha de defesa do *S. aureus* (MARTINEZ et al., 2001).

De acordo com Madigan, Martinko e Parker (1997), o coágulo produzido pela coagulase faz com que haja um acúmulo de fibrina ao redor das células bacterianas, isolando a área infectada, que dificulta o acesso dos mecanismos de defesas do hospedeiro. O coágulo ajuda a impedir a fagocitose de *S. aureus*, fazendo com que os leucócitos não consigam penetrar adequadamente nos coágulos de fibrina (SACHAECHTER et al., 2002).

A coagulase é encontrada sob duas formas, livre e conjugada, que possuem diferentes propriedades. A coagulase conjugada (ou fator de aglutinação) encontra-se unida à parede celular bacteriana e não está presente em filtrados de cultivo da bactéria. Esse fator reage diretamente com o fibrinogênio presente no plasma e produz uma rápida aglutinação das células bacterianas. A coagulase livre é secretada extracelularmente e reage com uma substância presente no plasma denominada “fator de reação com a coagulase (CRF)”, formando um complexo que, por sua vez, reage com o fibrinogênio para produzir o coágulo de fibrina (KONEMAN et al., 2001).

Existem numerosas formas alélicas da coagulase produzida por *S. aureus* e cada isolado pode produzir uma ou mais dessas variantes (GOH et al., 1992). Lawrence et al. (1996), descreveram que o polimorfismo do gene da coagulase (*coa*) é utilizado como marcador epidemiológico através de uma técnica de caracterização do *S. aureus*. A análise da sequência nucleotídica do *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 pequenas seqüências repetidas em tandem (SSRs – *short sequence repeats*) de 81 pb é utilizada em vários estudos epidemiológicos (Figura 15), pois permite subtipar isolados de *S. aureus* baseado no número de seqüências repetitivas e pela localização de sítios de restrição para endonucleases específicas (GOH et al., 1992).

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 (RAIMUNDO et al., 1999; SANTOS et al., 2003; SCHLEGELOVÁ et al., 2003).

➤ SSRs do gene *coa* - *Staphylococcus aureus* (81pb)

GCTCGCCCGA CACAAAACAA GCCAAGCGAA ACAAATGCAT  
 ACAACGTAAC AACACATGCA AATGGTCAAG TATCATATGG C

**Figura 15.** Esquema da região da seqüência repetitiva do gene da coagulase (*coa*).

Fonte: Shopsin et al. (2000).

## 2.12 A técnica da ribotipagem-PCR

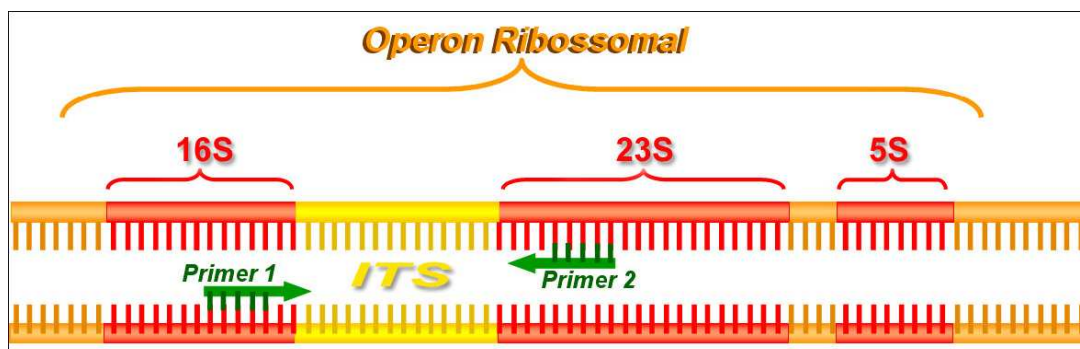
Os genes que codificam os rRNAs procarióticos são organizados em operons formados por três genes que codificam ordenadamente os rRNAs 16S, 23S e 5S separados por uma região espaçadora intergênica (ITS) entre cada gene, que contém um ou mais genes de tRNA (Figura 16). Esta estrutura é similar em diversas espécies bacterianas (GRIMONT; GRIMONT, 1991).

A filogenia dos seres vivos pode ser estabelecida pela comparação das seqüências de nucleotídeos de cada gene de rRNA que apresenta regiões com seqüências muito conservadas, que corresponde as regiões de interação das proteínas ribossomais com o rRNA, e regiões com seqüências variáveis entre as bactérias. Em especial as ITSs, que estão localizadas entre as regiões 16S e 23S dos rDNAs, sofrem uma menor pressão evolutiva, logo apresentam uma maior variação genética que as regiões codificantes do rRNA, fornecendo uma informação taxonômica ainda mais valiosa (GRIMONT; GRIMONT, 1991).

A transcrição de um gene de rRNA produz apenas uma única molécula, o RNA transcrito, diferentemente de genes codificantes de proteínas, onde cada produto transcrito dá



origem a um grande número de produtos de tradução. Esta pode ser a razão da alta demanda na síntese de rRNA e do número de cópias de genes codificando rRNA (TOUROVA, 2003).



**Figura 16.** Esquema representativo da região polimórfica espaçadora intergênica (ITS) 16S-23S de um operon ribossomal, mostrando localização do pareamento dos primers 1 e 2.  
Fonte: Kostman et al. (1992).

A análise do polimorfismo dos fragmentos da região intergênica 16S-23S amplificados por PCR foi empregado pela primeira vez como ferramenta de genotipagem entre isolados de *Pseudomonas cepacia*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli* e *Enterobacter* sp (KOSTMAN et al., 1992, 1995). Desde então, este método de tipagem, denominado ribotipagem-PCR, foi empregado para identificar e relacionar clones e linhagens clonais estafilocócicas de origem humana e animal, gerando padrões cepa-específicos e revelando-se uma técnica simples, reprodutível e de fácil interpretação (JENSEN; WEBSTER; STRAUS, 1993; BEZANSON; MACDONALD; DREBOT, 1995; KUMARI et al., 1997; BES et al., 2002; OLIVEIRA; RAMOS, 2002; PEREIRA et al., 2002; DAKIC et al., 2005; SHITTU et al., 2006).

Na espécie *S. aureus*, dentro de um genoma de aproximadamente 2,85 milhões de bases (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, 2006), segundo Gürtler, Barrie (1995) e Fogel et al. (1999), pode-se encontrar de 10 a 12 operons ribossomais.

### 3 JUSTIFICATIVA

*S. aureus* é o patógeno humano mais importante entre os estafilococos (KONEMAN et al., 2001) e um dos principais causadores de intoxicações alimentares no mundo inteiro (FREITAS et al., 2004, BERGDOLL, 1989), sendo estimado pelo CDC como causa de 185.000 casos anualmente nos Estados Unidos (MEAD et al., 1999). Este patógeno pode ocasionar outras doenças importantes como a Síndrome da Pele Escaldada e a Síndrome do Choque Tóxico por produzirem exotoxinas (DINGES; ORWIN; SCHLIEVERT, 2000; JOHNSON et al., 1991), constituindo um sério problema para a saúde pública (FISHER et al., 2007).

Populações naturais de *S. aureus* têm mostrado uma considerável variabilidade do conteúdo genômico (FITZGERALD et al., 2003). Uma identificação exata dos patógenos bacterianos é um requisito essencial tanto para detecção de reservatórios e fontes de infecção, quanto para o monitoramento da distribuição desses patógenos. As técnicas de tipagem molecular são epidemiologicamente importantes para o rastreamento de surtos de infecções, reconhecimento de clones virulentos, estabelecerem a relação clonal entre as amostras e monitoramento através de programas de controle e erradicação das doenças (OLIVE; BEAN, 1999).

*S. aureus* e seus fatores de patogenicidade já foram bastante estudados, entretanto mais pesquisas ainda devem ser realizadas para se compreender melhor o envolvimento desta bactéria na etiologia de várias doenças, para a prevenção das intoxicações alimentares e incremento no diagnóstico das exotoxinas reconhecidas e de outras toxinas do agente, otimizando o uso da biologia molecular que nos últimos anos tem trazido grande contribuição ao estudo deste microrganismo.

Diante da importância de *S. aureus* nas patologias humanas e da falta de estudos quanto à frequência de portadores desta bactéria na região Nordeste, realizou-se a investigação dos genes toxigênicos, do gene da coagulase e da dispersão dos *S. aureus*, isolados de amostras clínicas de origens diversas, no ambiente hospitalar para melhor compreender os fatores de patogenicidade deste microrganismo no homem.

#### **4 PERGUNTA CONDUTORA**

Qual a frequência e o grau de dispersão de *Staphylococcus aureus*, portadores dos genes toxigênicos e da enzima coagulase, isolados de amostras clínicas, em um hospital público da cidade do Recife?

## **5 HIPÓTESE**

Os isolados clínicos de *Staphylococcus aureus* são portadores dos genes toxigênicos e da enzima coagulase, apresentam grande polimorfismo genético e uma ampla dispersão no ambiente hospitalar.

## 6 OBJETIVOS

### 6.1 Objetivo Geral

Caracterizar genotipicamente *S. aureus* isolados de amostras clínicas de origens diversas, em um hospital público da cidade do Recife-PE.

### 6.2 Objetivos Específicos

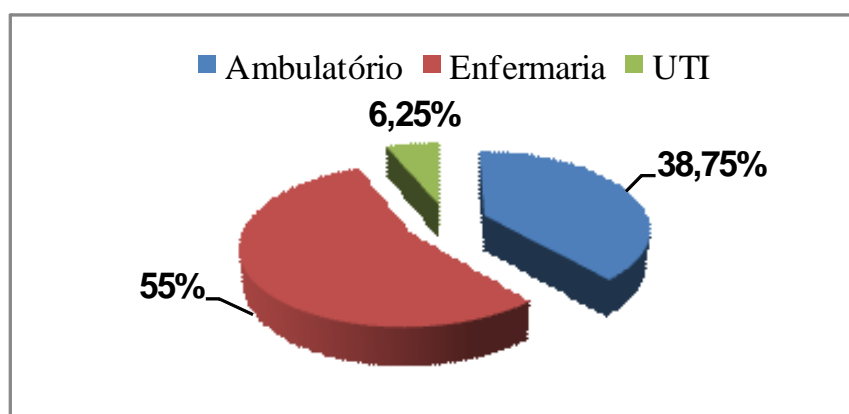
- a) Investigar a presença dos genes responsáveis pela produção das enterotoxinas clássicas (SEs) dos tipos A, B, C, D, E, além da G e H; toxina 1 da síndrome do choque tóxico TSST-1, e toxinas esfoliativas ETA e ETB, em *S. aureus* isolados de diferentes sítios de infecção e setores de um hospital público da cidade do Recife-PE;
- b) Realizar tipagem molecular, para verificar a dispersão do *S. aureus* nos diferentes setores do hospital, pela ribotipagem-PCR e análise do polimorfismo do gene da coagulase (*coa*);
- c) Correlacionar a produção de coagulase com a presença dos genes toxigênicos nos *S. aureus* estudados.

## 7 MATERIAL E MÉTODOS

### 7.1 Amostras de *S. aureus* estudadas

Foram estudados 80 isolados clínicos de *S. aureus*, gentilmente cedidos pelo Setor de Bacteriologia, da Unidade Laboratorial do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (HC), obtidos de diversas origens de infecção e oriundos de diferentes setores do hospital (Figura 17 e Tabela 1). Este projeto foi aprovado pelo comitê de ética do CPqAM (CAAE: 0024.0.095.000-07).

Para identificação dos microorganismos isolados, o Setor de Bacteriologia analisou as características fenotípicas das colônias crescidas em Agar Sangue (produção de hemolisina e pigmentos), além da utilização das técnicas de coloração de Gram e provas bioquímicas (catalase, coagulase, desoxirribonuclease, fermentação do manitol e susceptibilidade à novobiocina).



**Figura 17.** Percentual de distribuição dos isolados de *S. aureus* nos setores do hospital público de Recife-PE.

Fonte: Dados elaborados pelo próprio autor.

**Tabela 1.** Isolados de *S. aureus* estudados.

(Continua)

<i>S. aureus</i> isolados	Sítio de Infecção	Setor de isolamento no hospital	<i>S. aureus</i>	Sítio de Infecção	Setor de isolamento no hospital
<b>Sa1</b>	Urina	Ambulatório	<b>Sa41</b>	Cultura de Tecido de Ferida Operatória	Enfermaria
<b>Sa2</b>	Secreção Uretral	Ambulatório	<b>Sa42</b>	Cultura de Secreção de Cavidade de Tíbia	Enfermaria
<b>Sa3</b>	Secreção Vaginal	Ambulatório	<b>Sa43</b>	Ponta de Cateter	Enfermaria
<b>Sa4</b>	Urina	Ambulatório	<b>Sa44</b>	Cultura de Ferida Operatória	Enfermaria
<b>Sa5</b>	Urina	Ambulatório	<b>Sa45</b>	Secreção de Dreno Torácico	Enfermaria
<b>Sa6</b>	Urina	Ambulatório	<b>Sa46</b>	Cultura de Orofaringe	Ambulatório
<b>Sa7</b>	Urina	Ambulatório	<b>Sa47</b>	Ponta de Cateter	UTI
<b>Sa8</b>	Secreção Vaginal	Ambulatório	<b>Sa48</b>	Secreção de Úlcera	Ambulatório
<b>Sa9</b>	Esperma	Ambulatório	<b>Sa49</b>	Secreção de Orofaringe	Ambulatório
<b>Sa10</b>	Secreção Uretral	Ambulatório	<b>Sa50</b>	Secreção Nasal	Ambulatório
<b>Sa11</b>	Ponta de Cateter	Enfermaria	<b>Sa51</b>	Ponta de Cateter	Enfermaria
<b>Sa12</b>	Urina	Ambulatório	<b>Sa52</b>	Ponta de Cateter	Enfermaria
<b>Sa13</b>	Urina	Ambulatório	<b>Sa53</b>	Fragmento de Tecido de Ferida Operatória	Enfermaria
<b>Sa14</b>	Urina	Ambulatório	<b>Sa54</b>	Ponta de Cateter	Enfermaria
<b>Sa15</b>	Urina	Enfermaria	<b>Sa55</b>	Secreção Traqueal	UTI
<b>Sa16</b>	Urina	Ambulatório	<b>Sa56</b>	Ponta de Dreno	Enfermaria
<b>Sa17</b>	Urina	Ambulatório	<b>Sa57</b>	Exsudado Purulento do Antebraço	Enfermaria
<b>Sa18</b>	Urina	Enfermaria	<b>Sa58</b>	Fragmento Ósseo de Quadril	Enfermaria
<b>Sa19</b>	Urina	Ambulatório	<b>Sa59</b>	Secreção de Ferida Operatória	Enfermaria
<b>Sa20</b>	Sangue	UTI	<b>Sa60</b>	Secreção de Ferida (Transplante)	Enfermaria
<b>Sa21</b>	Urina	Enfermaria	<b>Sa61</b>	Ponta de Dreno	Enfermaria
<b>Sa22</b>	Urina	Ambulatório	<b>Sa62</b>	Secreção de Abscesso Joelho	Enfermaria
<b>Sa23</b>	Urina	Ambulatório	<b>Sa63</b>	Ponta de Cateter	Enfermaria
<b>Sa24</b>	Secreção de Prótese	Enfermaria	<b>Sa64</b>	Coleção Abdominal	Enfermaria
<b>Sa25</b>	Secreção de Ferida	Ambulatório	<b>Sa65</b>	Orofaringe	Enfermaria
<b>Sa26</b>	Ponta de Cateter	Enfermaria	<b>Sa66</b>	Secreção Traqueal	UTI
<b>Sa27</b>	Secreção de Ferida Operatória	Ambulatório	<b>Sa67</b>	Secreção de Ferida Operatória	Enfermaria
<b>Sa28</b>	Urina	Ambulatório	<b>Sa68</b>	Cultura de Secreção de Úlcera	Enfermaria
<b>Sa29</b>	Urina	Enfermaria	<b>Sa69</b>	Tecido Superficial e Profundo	Enfermaria
<b>Sa30</b>	Fragmento de Tecido	Enfermaria	<b>Sa70</b>	Secreção de Axila	Ambulatório
<b>Sa31</b>	Fragmento Ósseo Tíbia	Enfermaria	<b>Sa71</b>	Secreção de Fístula Direita	Ambulatório
<b>Sa32</b>	Ponta de Cateter	Enfermaria	<b>Sa72</b>	Secreção de Ferida Operatória	Enfermaria
<b>Sa33</b>	Secreção de Ferida Operatória	Enfermaria	<b>Sa73</b>	Ponta de Cateter	Enfermaria

**Tabela 1.** Isolados de *S. aureus* estudados.

(Conclusão)

<b>Sa34</b>	Sangue	Ambulatório	<b>Sa74</b>	Secreção de Cateter	Enfermaria
<b>Sa35</b>	Secreção Ocular	Enfermaria	<b>Sa75</b>	Sangue	Enfermaria
<b>Sa36</b>	Secreção Traqueal	UTI	<b>Sa76</b>	Secreção de Lesão Frontal	Ambulatório
<b>Sa37</b>	Secreção de Úlcera	Enfermaria	<b>Sa77</b>	Secreção Ocular	Enfermaria
<b>Sa38</b>	Fragmento Ósseo	Enfermaria	<b>Sa78</b>	Nasoorofaringe	Ambulatório
<b>Sa39</b>	Ponta de Cateter	Enfermaria	<b>Sa79</b>	Ponta de Cateter	Enfermaria
<b>Sa40</b>	Abscesso da Coxa	Enfermaria	<b>Sa80</b>	Secreção de Ferida Operatória	Ambulatório

Fonte: Dados elaborados pelo próprio autor.



## 7. 2 Extração do DNA genômico

Para a realização do trabalho os isolados foram plaqueados em Agar Sangue e incubados a 37°C por 24 horas, com o objetivo de confirmar a pureza das culturas. Em seguida colônias isoladas foram repicadas individualmente e crescidas em BHI (Brain Heart Infusion, Biobrás) para extração do DNA.

Os isolados de *S. aureus* foram incubados a 37°C por 24 horas em 5mL de caldo BHI. O DNA dos isolados foi extraído a partir de um mililitro da cultura bacteriana que foi transferido para um microtubo e centrifugado (2.500 x g) a 4°C durante 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e, ao sedimento, adicionou-se 500µL de TE 10:1 (Tris-HCl 10mM, pH 8,0; EDTA 1mM). Após nova centrifugação (2.500 x g) por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e, ao sedimento, foi adicionado mais 500µL de TE 10:1, 10µL de solução de lisozima (10 mg/mL) e 10µL de solução de proteinase K (5 mg/mL). Os microtubos foram incubados a 60°C por 20 minutos para iniciar a lise bacteriana. Logo em seguida, foi adicionado 100µL de STE (SDS 2,5%; Tris-HCl 10mM, pH 8,0; EDTA 0,25M), incubando-se por mais 15 minutos a 60°C.

Após 5 minutos à temperatura ambiente e 5 minutos no gelo, a suspensão foi neutralizada com 130µL de acetato de amônio 7,5M, permanecendo no gelo por 15 minutos. A suspensão foi então centrifugada (2.500 x g) por 10 minutos e o sobrenadante, aproximadamente 700µL, foi transferido para um novo microtubo, onde foi adicionado o mesmo volume de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1), homogeneizado e centrifugando (2.500 x g) por 5 minutos, para precipitação das proteínas e restos celulares. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo. O DNA foi precipitado com a adição de aproximadamente 420µL de isopropanol a -20°C por 24 horas.

Os tubos foram centrifugados por 10 minutos (2.500 x g) e, após eliminação do sobrenadante, o sedimento, contendo o DNA foi seco em centrífuga a vácuo (Eppendorf Concentrator 5301) por 5 minutos. O DNA genômico foi finalmente ressuspenso em 10µL de água deionizada estéril e quantificado por meio de eletroforese em gel de agarose 1% (m/v) em tampão TBE 0,5X (Tris-borato 0,089M; ácido bórico 0,089M; EDTA, 0,002M) a 120V. Após a migração, o DNA foi corado em solução aquosa de brometo de etídio (15 mg/mL), observado e fotografado em transiluminador de luz ultravioleta (UV). A quantificação do DNA foi realizada por comparação com quantidade padrão de DNA do fago λ clivado com

enzima de restrição *Hind*III (marcador) usando o programa 1D Image Analysis Software, version 3.5 da Kodak Digital Science, DC 120 zoom Digital Câmera.

### 7.3 Investigação dos genes responsáveis pelas exotoxinas em *S. aureus*

Foram investigados os genes responsáveis pelas enterotoxinas estafilocócicas (SEA, SEB, SEC, SED, SEE, SEG e SEH), além das toxinas estafilocócicas esfoliativas (ETA e ETB) e a toxina 1 da síndrome do choque tóxico (TSST-1).

Duas reações de PCR-multiplex foram preparadas; uma designada para detectar os genes das enterotoxinas estafilocócicas (*sea-see*) e outra para detectar os genes *tst*, *eta* e *etb*. As amplificações foram realizadas num termociclador programado para 30 ciclos, compreendendo 95°C para desnaturação da fita de DNA por 1 minuto, 60°C para anelamento dos *primers* por 1 minuto e 72°C para síntese da fita por 2 minutos. Os *primers* foram desenhados como descrito por Becker, Roth e Peters (1998) (tabela 2).

As reações para PCR-multiplex foram preparadas para um volume final de 25µL contendo 20pmol de cada *primer*, 10mM Tris-HCl, pH 9,0, 50mM de KCl, 160µM de cada dNTP, 3mM de MgCl<sub>2</sub>, 20ng de DNA genômico e 1,2U da *Taq* DNA polimerase (Invitrogen, Brasil). Como controle da especificidade das reações de PCR, foram utilizadas as cepas padrão de *S. aureus* FRI (Food Research Institute Madison, Wiscosin, EUA); FRI MN8 portadora do gene *tst*, FRI 722 portadora do gene *sea*, FRI S6 gene *seb*, FRI 361 genes *sec*, *sed*, *seg*, *sei* e *sej* e FRI 1151 gene *sed*, cedidas gentilmente pelo Laboratório de Enterotoxinas Estafilocócicas da Fundação Ezequiel Dias (FUNED-MG).

Para pesquisa do gene *seg* e *seh* foi realizada uma PCR-uniplex usando *primers* desenhados como descrito por Rosec, Gigaude (2002) (tabela 2). As amplificações foram aquecidas a 94°C por 3 minutos, seguido de 50 ciclos de 94°C por 30 segs, 60°C por 30 segs e 72°C por 30 segs. As reações consistiram de uma mistura de 20pmol de cada *primer*, 160µM de cada dNTP, 1,5mM do MgCl<sub>2</sub>, 10mM do Tris-HCl pH 9, 50mM de KCl, 20ng do DNA genômico e 1U da *Taq* DNA polimerase (Invitrogen, Brasil) para um volume final de 25µL. Foi usada para controle a cepa padrão de *S. aureus* FRI 361 portadora dos genes *sec*, *sed*, *seg*, *sei* e *sej* e a cepa CR6 portadora do gene *seh*.

Os produtos de amplificação (*amplicons*) foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5% (m/v), corados com brometo de etídio (1,5 mg/mL), visualizados e fotografados em transiluminador de UV. Alguns *amplicons* foram purificados e seqüenciados para confirmar a similaridade com os genes toxigênicos depositados em banco de dado público (www.ncbi.nlm.nih.com). As seqüências obtidas foram analisadas pelo programa blast versão 2.2.12. (ALTSUL et al., 1990).

**Tabela 2.** Seqüências de *primers* usados na análise da PCR para a detecção dos genes *sea-see*, *seg*, *seh*, *tst*, *eta* e *etb* em isolados de *S. aureus*, oriundos de amostras clínicas, de um hospital público de Recife-PE.

Gene	Primer	Seqüência de Oligonucleotídeos (5' → 3')	Tamanho Esperado do Fragmento (pb)
* <i>sea</i>	SEA-3b	CCT TTG GAA ACG GTT AAA ACG	127
	SEA-4b	TCT GAA CCT TCC CAT CAA AAA C	
* <i>seb</i>	SEB-1c	TCG CAT CAA ACT GAC AAA CG	477
	SEB-4b	GCA GGT ACT CTA TAA GTG CCT GC	
* <i>sec</i>	SEC-3b	CTC AAG AAC TAG ACA TAA AAG CTA GG	271
	SEC-4b	TCA AAA TCG GAT TAA CAT TAT CC	
* <i>sed</i>	SED-3b	CTA GTT TGG TAA TAT CTC CTT TAA ACG	319
	SED-4b	TTA ATG CTA TAT CTT ATA GGG TAA ACA TC	
* <i>see</i>	SEE-3b	CAG TAC CTA TAG ATA AAG TTA AAA CAA GC	178
	SEE-2c	TAA CTT ACC GTG GAC CCT TC	
* <i>tst</i>	TST-3	AAGCCCTTTGTTGCTTGCG	445
	TST-6	ATCGAACTTTGGCCATACTTT	
* <i>eta</i>	ETA-3b	CTAGTGCATTTGTTATTCAAGACG	119
	ETA-4b	TGCATTGACACCATAGTACTTATTC	
* <i>etb</i>	ETB-3b	ACG GCT ATA TAC ATT CAA TTC AAT G	262
	ETB-4b	AAA GTT ATT CAT TTA ATG CAC TGT CTC	
** <i>seg</i>	SEG-1	ACGTCTCCACCTGTTGAAGG	400
	SEG-2	TGAGCCAGTGTCTTGCTTTG	
** <i>seh</i>	SEH-1	TCACATCATATGCGAAAGCAG	357
	SHE-2	TAGCACCAATCACCCCTTCC	

Fonte: \*Becker, Roth e Peters (1998); \*\*Rosec, Gigaud (2002).

#### 7.4 Pesquisa do gene da coagulase (*coa*) em *S. aureus*

A região 3'- terminal do gene *coa* foi amplificada utilizando os seguintes *primers* específicos *COAG2* (5' ACC ACA AGG TAC TGA ATC AAC G 3') e *COAG3* (5' TGC TTT CGA TTG TTC GAT GC 3') descritos por Aarestrup, Dangle e Sordillo (1995). As reações de amplificação foram preparadas para um volume final de 25µL, contendo: 20ng do DNA genômico, tampão PCR 10x (10mM Tris-HCl, pH 9,0; 50mM de KCl), 1,5mM de MgCl<sub>2</sub>, 1µM de cada *primer*, 200µM de desoxinucleotídeos trifosfato (dNTP's) e 1U de *Taq* DNA Polimerase, completando-se com água deionizada estéril. Como controle positivo foi utilizada a cepa de *S. aureus* n° 25923 proveniente da *American Type Culture Collection*.

As amostras foram submetidas a 40 ciclos térmicos, cada um consistindo de 30 segundos a 95°C, 2 minutos a 62°C e 4 minutos a 72°C. Os *amplicons* foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5% (m/v), corados com brometo de etídio (15 mg/mL), visualizados e fotografados em transiluminador de UV. Foi utilizado um marcador de peso molecular de 100pb (DNA *ladder*) para calcular o tamanho dos *amplicons*.

#### 7.5 Ribotipagem-PCR

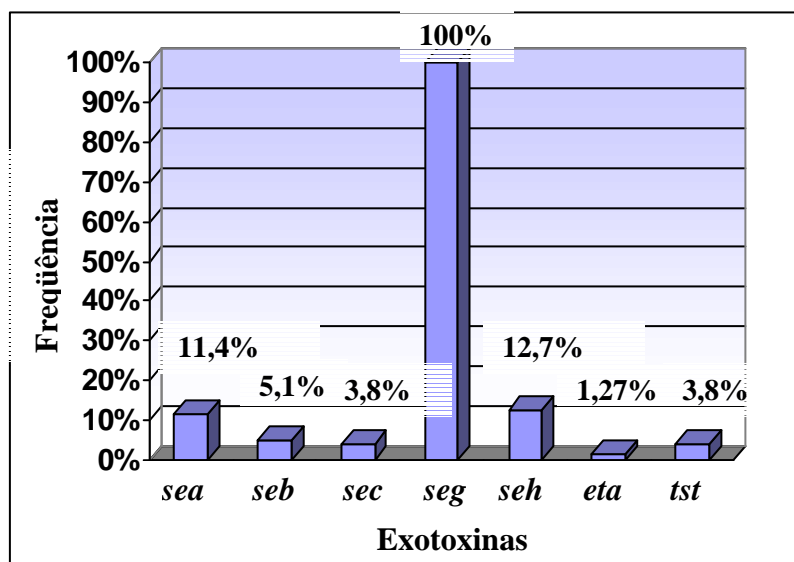
Para amplificação da região 16S-23S, foi utilizado um par de oligonucleotídeos descritos por Jensen, Webster e Straus (1993) [RIB] (5'-GAA GTC GTA ACA AGG-3' e 5'-CAA GGC CAC CGT-3'). A reação foi preparada para um volume final de 25µL contendo 20pmol de cada oligonucleotídeo, 20ng de DNA, 10mM Tris-HCl pH 9,0, 50mM KCl, 1,5mM MgCl<sub>2</sub>, 1U de *Taq* DNA polimerase e 200µM de dNTPs. Os 30 ciclos de amplificação consistiram em 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 55°C e 1 minuto a 72°C, seguido de uma extensão final de 4 minutos a 72°C.

Os *amplicons* foram analisados por eletroforese em géis de agarose a 2.0%, corados com brometo de etídio, visualizados e fotografados em transiluminador de luz UV. Um marcador de peso molecular (DNA *ladder* de 100 pb) foi utilizado como padrão para estimar o tamanho dos fragmentos amplificados.

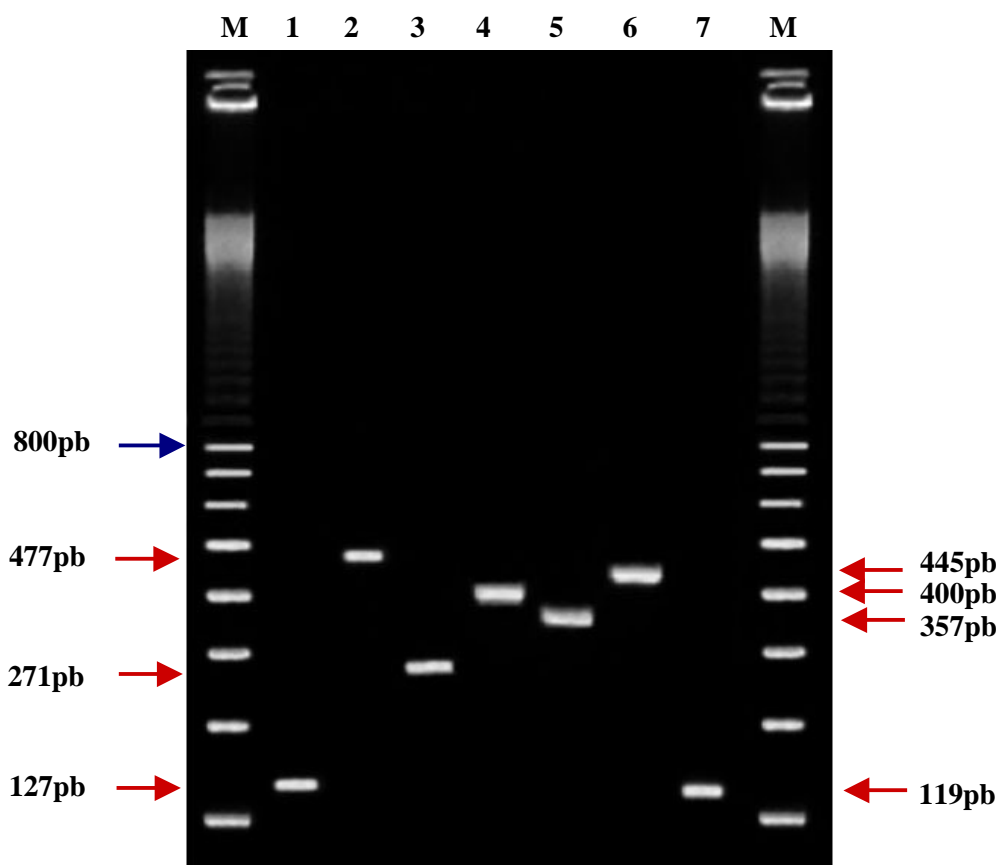
## 8 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 8.1 Pesquisa das exotoxinas em *S. aureus*, isolados de amostras clínicas diversas, em diferentes setores de um hospital público de Recife-PE

Nas reações de PCR, nenhum dos isolados analisados possuía os genes *sed*, *see* e *etb*. Houve apenas a amplificação do segmento de tamanho esperado para o gene *sed* na cepa de referência (*S. aureus* FRI 1151) usada como controle positivo. Entretanto, 79/80 (98,75%) dos isolados de *S. aureus* foram positivos para os genes toxigênicos, amplificando os genes *sea*, *seb*, *sec*, *seg*, *seh*, *eta* e *tst* separadamente ou em associações. Apenas um isolado proveniente de hemocultura da Unidade de Tratamento Intensivo (UTI) não amplificou nenhum dos genes toxigênicos estudados. O gene prevalente foi *seg*, presente em todas as amostras positivas para genes toxigênicos 79/79 (100%), seguido por *seh* 10/79 (12,7%) e *sea* 09/79 (11,4%) (Figuras 18, 19 e Tabela 3).



**Figura 18.** Frequências dos genes *sea*, *seb*, *sec*, *seg*, *seh*, *eta* e *tst* nos isolados de *S. aureus*.  
Fonte: Dados elaborados pelo próprio autor.



**Figura 19.** Gel representativo dos produtos de amplificação da PCR dos genes toxigênicos nos isolados de *S. aureus*.

Fonte: Dados elaborados pelo próprio autor.

Nota: Linha **M**, marcador de peso molecular (100pb DNA *ladder*). Linha **1**-Sa50 (*sea*), Linha **2**- Sa14 (*seb*), Linha **3**- Sa32 (*sec*), Linha **4**- Sa63 (*seg*), Linha **5**- Sa26 (*seh*), Linha **6**- Sa80 (*tst*), Linha **7**- Sa17 (*eta*).

O gene *seg* foi encontrado em *S. aureus* isolados no ambulatório, na enfermaria e na UTI, sendo mais freqüente na enfermaria e o único gene encontrado nos isolados oriundos da UTI. Os genes *sea*, *seb*, *sec*, *seh* e *tst* foram identificados em *S. aureus* isolados no ambulatório e na enfermaria, sendo mais freqüentemente encontrados no ambulatório. O gene *eta* foi observado em apenas um isolado proveniente do ambulatório, oriundo de amostra de urina (Tabela 3).

**Tabela 3.** Distribuição dos genes das exotoxinas positivas pela PCR nos *S. aureus* isolados nos diferentes setores do hospital.

Genes das exotoxinas	Nº de isolados	(%)	Distribuição dos isolados de <i>S. aureus</i> nos setores do hospital
<i>sea</i>	09	11,4	05 isolados no ambulatório 04 isolados na enfermaria
<i>seb</i>	04	5,1	03 isolados no ambulatório 01 isolado na enfermaria
<i>sec</i>	03	3,8	02 isolados no ambulatório 01 isolado na enfermaria
<i>seg</i>	79	100	31 isolados no ambulatório 44 isolados na enfermaria 04 isolados na UTI
<i>seh</i>	10	12,7	06 isolados no ambulatório 04 isolados na enfermaria
<i>eta</i>	01	1,27	01 isolado no ambulatório
<i>tst</i>	03	3,8	02 isolados no ambulatório 01 isolado na enfermaria

Fonte: Dados elaborados pelo próprio autor.

Os 79 isolados de *S. aureus*, positivos nas reações de PCR para os genes toxigênicos, foram distribuídos em 10 genótipos. Os genótipos mais frequentes foram: *seg* isoladamente em 56/79 (70,9%) e em associações como *seg*+ *seh* em 06/79 (7,6%) e *seg* + *sea* em 05/79 (6,3%) dos isolados. Entre os isolados positivos, 56/79 (70,9%) amplificaram apenas um gene, 17/79 (21,5%) amplificaram dois genes, 05/79 (6,3%) amplificaram três genes e 01/79 (1,3%) amplificou quatro genes (Tabela 4). A presença de mais de um gene toxigênico num isolado de paciente favorece a sua patogenicidade e manutenção no hospedeiro.

Neste estudo, a frequência de isolados comportando os genes que codificam as toxinas mais recentemente descritas (SEG e SEH) foi significativa. O gene *seg* foi observado em todas as amostras positivas para os genes toxigênicos e o gene *seh* foi o segundo mais frequente, presente em 12,7% dos isolados positivos para os genes toxigênicos. Com exceção de *eta*, presente em apenas um isolado procedente do ambulatório, todos os genes amplificados foram observados tanto no ambulatório, quanto na enfermaria.

O gene *seg* foi o único observado em todos os setores do hospital estudado (ambulatório, enfermaria e UTI), e o único gene presente nos isolados deste último setor (Tabela 3). Todos os três genes das toxinas clássicas (*sea*, *seb* e *sec*) foram observados

associados ao gene *seg* mais recentemente descrito. O gene *tst* foi observado em associação à *seg* e *sec* e o gene *eta* associado à *seg* (Tabela 4).

**Tabela 4.** Genótipos observados nos isolados de *S. aureus* estudados.

<b>Genótipos</b>	<b>Nº de isolados</b>	<b>(%)</b>
<b>1. <i>seg</i></b>	56	70,9
<b>2. <i>seg</i> + <i>sec</i></b>	01	1,3
<b>3. <i>seg</i> + <i>sea</i></b>	05	6,3
<b>4. <i>seg</i> + <i>seb</i></b>	03	3,8
<b>5. <i>seg</i> + <i>tst</i></b>	01	1,3
<b>6. <i>seg</i> + <i>eta</i></b>	01	1,3
<b>7. <i>seg</i> + <i>seh</i></b>	06	7,6
<b>8. <i>seg</i> + <i>sec</i> + <i>tst</i></b>	02	2,5
<b>9. <i>seg</i> + <i>sea</i> + <i>seh</i></b>	03	3,8
<b>10. <i>seg</i> + <i>sea</i> + <i>seb</i> + <i>seh</i></b>	01	1,3

Fonte: Dados elaborados pelo próprio autor.

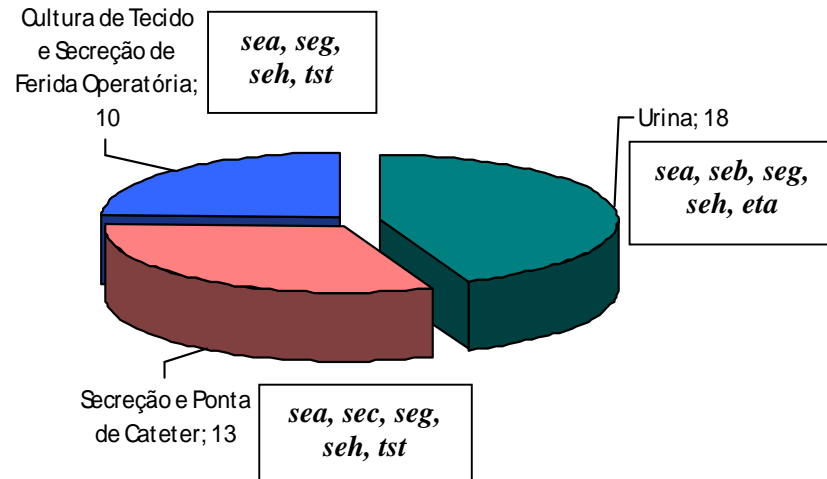
Foram observados três sítios de infecção mais frequentes: urina (18 isolados), os genes toxigênicos observados nos isolados de *S. aureus* provenientes deste sítio foram *sea*, *seb*, *seg*, *seh* e *eta*; secreção e ponta de cateter (13 isolados), genes *sea*, *sec*, *seg*, *seh* e *tst*; cultura de tecido e secreção de ferida operatória (10 isolados), genes *sea*, *seg*, *seh* e *tst*. Os genes *sea*, *seg*, *seh* foram observados em *S. aureus* isolados em todos os principais sítios de infecção (Figura 20 e Tabela 5).

É importante ressaltar que *tst* foi observado em três isolados provenientes de secreção vaginal (paciente ambulatorial), ponta de cateter (paciente de enfermaria) e secreção de ferida operatória (paciente ambulatorial). *S. aureus* é o responsável pelos casos menstruais da Síndrome do Choque Tóxico e por cerca de metade dos casos não menstruais. De acordo com Koneman et al. (2001), esta síndrome pode ser descrita como uma complicação de abscessos estafilocócicos, osteomielite, infecções de feridas cirúrgicas e pneumonia pós-influenza.

O gene *eta* foi verificado em apenas um isolado, procedente de urina, em um paciente ambulatorial. Os baixos índices de isolados portadores dos genes *eta* e *etb* estão em conformidade com outras investigações, que demonstraram a baixa frequência dos dados epidemiológicos sobre *S. aureus* portadores destes genes. Yamasaki et al. (2005), relataram que cerca de 51% dos *S. aureus* isolados de crianças com Síndrome da Pele Escaldada



produzem ambas as toxinas epidermolíticas, 30% produzem apenas ETA e 19% produzem apenas ETB.



**Figura 20.** Sítios mais frequentes de infecção por *S. aureus* e os genes das exotoxinas relacionados.  
Fonte: Dados elaborados pelo próprio autor.

**Tabela 5.** Genes das exotoxinas, sítios de infecção e distribuição dos *S. aureus* no hospital.

(Continua)

<i>S.aureus</i> isolados	Sítio de Infecção	Setor no hospital	<i>sea</i>	<i>seb</i>	<i>sec</i>	<i>seg</i>	<i>seh</i>	<i>eta</i>	<i>tst</i>
Sa1	Urina	Ambulatório	-	-	-	+	+	-	-
Sa2	Secreção Uretral	Ambulatório	-	-	-	+	-	-	-
Sa3	Secreção Vaginal	Ambulatório	-	-	+	+	-	-	-
Sa4	Urina	Ambulatório	-	-	-	+	+	-	-
Sa5	Urina	Ambulatório	-	-	-	+	+	-	-
Sa6	Urina	Ambulatório	-	-	-	+	-	-	-
Sa7	Urina	Ambulatório	-	-	-	+	-	-	-
Sa8	Secreção Vaginal	Ambulatório	-	-	+	+	-	-	+
Sa9	Esperma	Ambulatório	-	-	-	+	-	-	-
Sa10	Secreção Uretral	Ambulatório	+	-	-	+	+	-	-
Sa11	Ponta de Cateter	Enfermaria	-	-	-	+	-	-	-
Sa12	Urina	Ambulatório	-	-	-	+	-	-	-
Sa13	Urina	Ambulatório	-	+	-	+	-	-	-
Sa14	Urina	Ambulatório	-	+	-	+	-	-	-
Sa15	Urina	Enfermaria	-	-	-	+	-	-	-
Sa16	Urina	Ambulatório	+	+	-	+	+	-	-
Sa17	Urina	Ambulatório	-	-	-	+	-	+	-
Sa18	Urina	Enfermaria	-	-	-	+	-	-	-
Sa19	Urina	Ambulatório	-	-	-	+	-	-	-
Sa20	Sangue	UTI	-	-	-	-	-	-	-
Sa21	Urina	Enfermaria	-	-	-	+	-	-	-
Sa22	Urina	Ambulatório	-	-	-	+	-	-	-
Sa23	Urina	Ambulatório	-	-	-	+	-	-	-
Sa24	Secreção de Prótese	Enfermaria	+	-	-	+	-	-	-
Sa25	Secreção de Ferida	Ambulatório	+	-	-	+	+	-	-
Sa26	Ponta de Cateter	Enfermaria	+	-	-	+	+	-	-
Sa27	Secreção de Ferida Operatória	Ambulatório	+	-	-	+	-	-	-
Sa28	Urina	Ambulatório	-	-	-	+	-	-	-
Sa29	Urina	Enfermaria	-	-	-	+	-	-	-
Sa30	Fragmento de Tecido	Enfermaria	-	-	-	+	-	-	-
Sa31	Fragmento Ósseo Tíbia	Enfermaria	-	-	-	+	-	-	-
Sa32	Ponta de Cateter	Enfermaria	-	-	+	+	-	-	+
Sa33	Secreção de Ferida Operatória	Enfermaria	-	-	-	+	-	-	-
Sa34	Sangue	Ambulatório	-	-	-	+	-	-	-

**Tabela 5.** Genes das exotoxinas, sítios de infecção e distribuição dos *S. aureus* no hospital.

(Continuação)

<i>S.aureus</i> isolados	Sítio de Infecção	Distribuição no hospital	<i>sea</i>	<i>seb</i>	<i>sec</i>	<i>seg</i>	<i>seh</i>	<i>eta</i>	<i>tst</i>
Sa35	Secreção Ocular	Enfermaria	+	-	-	+	-	-	-
Sa36	Secreção Traqueal	UTI	-	-	-	+	-	-	-
Sa37	Secreção de Úlcera	Enfermaria	-	-	-	+	-	-	-
Sa38	Fragmento Ósseo	Enfermaria	-	-	-	+	-	-	-
Sa39	Ponta de Cateter	Enfermaria	-	-	-	+	-	-	-
Sa40	Abscesso da Coxa	Enfermaria	-	-	-	+	-	-	-
Sa41	Cultura de Tecido de Ferida Operatória	Enfermaria	-	-	-	+	-	-	-
Sa42	Cultura de Secreção de Cavidade de Tíbia	Enfermaria	+	-	-	+	-	-	-
Sa43	Ponta de Cateter	Enfermaria	-	-	-	+	-	-	-
Sa44	Cultura de Ferida Operatória	Enfermaria	-	-	-	+	-	-	-
Sa45	Secreção de Dreno Torácico	Enfermaria	-	-	-	+	-	-	-
Sa46	Cultura de Orofaringe	Ambulatório	-	-	-	+	-	-	-
Sa47	Ponta de Cateter	UTI	-	-	-	+	-	-	-
Sa48	Secreção de Úlcera	Ambulatório	-	-	-	+	-	-	-
Sa49	Secreção de Orofaringe	Ambulatório	-	-	-	+	-	-	-
Sa50	Secreção Nasal	Ambulatório	+	-	-	+	-	-	-
Sa51	Ponta de Cateter	Enfermaria	-	-	-	+	-	-	-
Sa52	Ponta de Cateter	Enfermaria	-	-	-	+	-	-	-
Sa53	Fragmento de Tecido de Ferida Operatória	Enfermaria	-	-	-	+	-	-	-
Sa54	Ponta de Cateter	Enfermaria	-	-	-	+	-	-	-
Sa55	Secreção Traqueal	UTI	-	-	-	+	-	-	-
Sa56	Ponta de Dreno	Enfermaria	-	-	-	+	-	-	-
Sa57	Exsudado Purulento do Antebraço	Enfermaria	-	-	-	+	-	-	-
Sa58	Fragmento Ósseo de Quadril	Enfermaria	-	-	-	+	-	-	-
Sa59	Secreção de Ferida Operatória	Enfermaria	-	-	-	+	-	-	-
Sa60	Secreção de Ferida (Transplante)	Enfermaria	-	-	-	+	-	-	-
Sa61	Ponta de Dreno	Enfermaria	-	-	-	+	-	-	-
Sa62	Secreção de Abscesso Joelho	Enfermaria	-	-	-	+	+	-	-
Sa63	Ponta de Cateter	Enfermaria	-	-	-	+	-	-	-
Sa64	Coleção Abdominal	Enfermaria	-	-	-	+	-	-	-
Sa65	Orofaringe	Enfermaria	-	-	-	+	+	-	-
Sa66	Secreção Traqueal	UTI	-	-	-	+	-	-	-
Sa67	Secreção de Ferida Operatória	Enfermaria	-	-	-	+	-	-	-
Sa68	Cultura de Secreção de Úlcera	Enfermaria	-	+	-	+	-	-	-
Sa69	Tecido Superficial e Profundo	Enfermaria	-	-	-	+	-	-	-
Sa70	Secreção de Axila	Ambulatório	-	-	-	+	-	-	-

**Tabela 5.** Genes das exotoxinas, sítios de infecção e distribuição dos *S. aureus* no hospital.

(Conclusão)

<i>S.aureus</i> isolados	Sítio de Infecção	Distribuição no hospital	<i>sea</i>	<i>seb</i>	<i>sec</i>	<i>seg</i>	<i>seh</i>	<i>eta</i>	<i>tst</i>
<b>Sa71</b>	Secreção de Fístula Direita	Ambulatório	-	-	-	+	-	-	-
<b>Sa72</b>	Secreção de Ferida Operatória	Enfermaria	-	-	-	+	+	-	-
<b>Sa73</b>	Ponta de Cateter	Enfermaria	-	-	-	+	-	-	-
<b>Sa74</b>	Secreção de Cateter	Enfermaria	-	-	-	+	-	-	-
<b>Sa75</b>	Sangue	Enfermaria	-	-	-	+	-	-	-
<b>Sa76</b>	Secreção de Lesão Frontal	Ambulatório	-	-	-	+	-	-	-
<b>Sa77</b>	Secreção Ocular	Enfermaria	-	-	-	+	-	-	-
<b>Sa78</b>	Nasoorofaringe	Ambulatório	-	-	-	+	-	-	-
<b>Sa79</b>	Ponta de Cateter	Enfermaria	-	-	-	+	-	-	-
<b>Sa80</b>	Secreção de Ferida Operatória	Ambulatório	-	-	-	+	-	-	+

Fonte: Dados elaborados pelo próprio autor.

Segundo Becker et al (2003), dos 429 *S. aureus* isolados de humanos na Alemanha (pacientes de unidades gerais e de terapia intensiva de 32 hospitais de comunidades e universidades), apenas cinco (1,2%) foram positivos para um ou ambos os genes epidermolíticos (*eta* e *etb*). Um isolado proveniente de amostra de sangue, positivo para *eta*, comportava também os genes *seg* e *sei* e dois isolados oriundos da região nasal comportavam *eta* e *etb*. Neste mesmo estudo, os genes mais freqüentes foram *seg* e *sei* (55%) encontrados apenas em estrita associação. Dos genes clássicos, os mais comuns foram *tst* (20,3%), seguido por *sea* (15,9%) e *sec* (11,2%).

Em uma pesquisa realizada no Japão, Omoe et al. (2002) analisaram a presença de genes das enterotoxinas estafilocócicas (*sea* a *sei*) em 146 isolados de *S. aureus*, 71 destes oriundos de humanos envolvidos em 25 surtos de intoxicações alimentares, 18 de humanos sadios, 21 de vacas com mastite e 36 de leite de vaca. Constataram que 113 (77,4%) dos isolados foram positivos para um ou mais genes de SEs, dentre os quais 56 isolados portavam o gene *seg* e 52 o gene *sei*. Dos 89 isolados de humanos (sadios e envolvidos em intoxicação alimentar) os genes prevalentes foram *seh* e *seb* (42 isolados), seguidos por *sea* (35 isolados) e *seg* (25 isolados).

Foi realizado, em um Centro Pediátrico na Polônia, um estudo com 33 pacientes ambulatoriais e 47 pacientes hospitalizados com infecção do trato respiratório superior, onde apenas um isolado de *S. aureus* por paciente foi analisado. Dos 80 isolados de portadores nasais de *S. aureus*, 61 (76%) foram positivos para genes toxigênicos: *seg* (47), *sec* (14), *sea* (7), *seb* (4), *sed* (4), *seh* (3) e *tst* (10). A maioria dos genes clássicos (*sea-sed*) estava associada aos genes enterotoxigênicos mais recentemente descritos (*seg*, *sei*, *sem*, *sen*, *seo*, *seu*) (BANIA et al., 2006).

Em diferentes regiões do mundo são observados distintos percentuais para os genes toxigênicos (SILVA et al., 2005). O papel destas SEs recentemente descritas na intoxicação alimentar estafilocócica, ainda permanece 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 toxinas clássicas SEA, SEB, SEC, SED ou SEE, mas detectaram a presença dos genes toxigênicos *seg*, *seh*, *sei* e *sej*, indicando que estas novas SEs podem ser responsáveis por tais surtos de intoxicação alimentar.

Em um surto de intoxicação alimentar, causado por purê de batata, feito com leite cru, observou-se a presença de *S. aureus* portadores apenas do gene *seh*. A pesquisa para as enterotoxinas clássicas SEA-SEE foi negativa (JORGENSEN et al. 2005). Os isolados

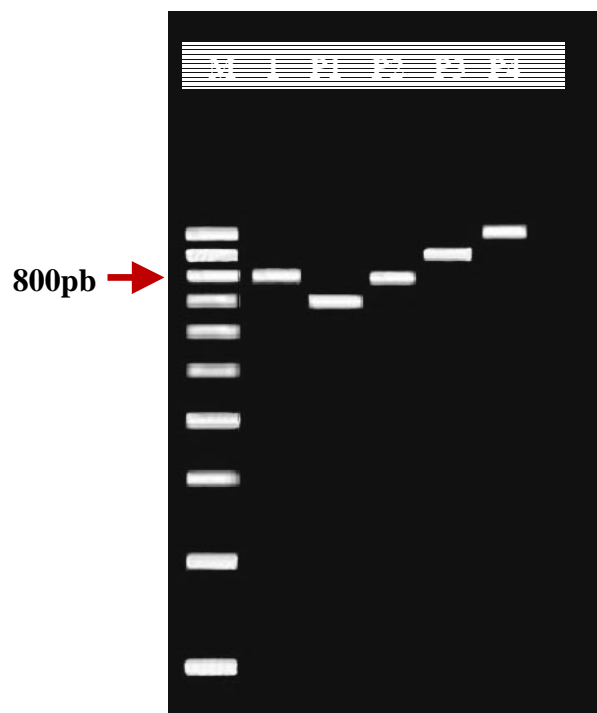
testados produziram quantidades significantes (98 a 108 ng) de SEH. O que significa que cepas de *S. aureus* portadoras do gene *seh* podem produzir quantidades de SEH suficientes para causar intoxicação.

Em conclusão, os dados observados nas pesquisas citadas corroboram com os nossos resultados, em relação à expressiva presença dos genes das toxinas mais recentemente estudadas em *S. aureus* e também retificam a observação de que apenas os genes responsáveis pelas toxinas clássicas estão envolvidos em intoxicações alimentares e outras doenças.

*S. aureus* enterotoxigênico representa um risco para a saúde pública, uma vez que esta bactéria é frequentemente envolvida em doenças de origem comunitária e hospitalar. A aplicação de técnicas moleculares na detecção das exotoxinas estafilocócicas é um passo relevante para se caracterizar rapidamente estas toxinas, além de gerar informações que possam contribuir para o conhecimento e controle da dispersão das doenças.

## **8.2 Tipagem molecular dos *S. aureus* isolados de amostras clínicas, através polimorfismo do gene da coagulase (*coa*)**

Todos os isolados caracterizados pelos métodos microbiológicos citados como *S. aureus* amplificaram o gene *coa* na reação de PCR. A amplificação do gene *coa* dos *S. aureus* isolados de amostras clínicas produziu quatro perfis genotípicos. Desta forma, os isolados foram distribuídos em quatro coagulotipos, de acordo com o tamanho do segmento amplificado (Perfil 1= ~700pb, Perfil 2= ~800pb, Perfil 3= ~900pb e Perfil 4= ~1000pb). A cepa utilizada como controle positivo (*S. aureus* ATCC 25923) amplificou um fragmento de ~800pb (Figura 21).



**Figura 21.** Perfis eletroforéticos representativos dos produtos de PCR do gene *coa* de 80 isolados clínicos de *S. aureus*.

Fonte: Dados elaborados pelo próprio autor.

Nota: Marcador de peso molecular, linha **M** (100 pb DNA *ladder*). Controle positivo, linha **1** (*S. aureus* ATCC 25923): ~800pb. Coagulotipos: P1=~700pb, P2=~800pb, P3=~900pb e P4=~1000pb.

A maioria dos isolados 39/80 (48,75%) amplificou um fragmento de ~800pb /P2. Estes isolados estavam distribuídos no ambulatório e na enfermaria, com maior frequência na enfermaria. O perfil 1 foi o segundo mais frequente neste estudo 35/80 (43,75%) e observado nos isolados presentes nos três setores do hospital (ambulatório, enfermaria e UTI), sendo o único presente na UTI. Apenas cinco isolados amplificaram um fragmento de ~1000pb (P4), presentes na enfermaria e no ambulatório quase de forma equivalente. O perfil 3 foi observado em apenas um isolado presente na enfermaria (Tabela 6).

**Tabela 6.** Resultados da PCR do gene *coa* de *S. aureus* isolados de amostras clínicas em um hospital público do Recife-PE.

(Continua)

Coagulotipos	Produto de PCRa	Nº de isolados	(%)	Distribuição dos isolados de <i>S. aureus</i> no hospital	Sítio de infecção
<b>Perfil 1</b>	<b>700</b>	35	43,75	11 isolados no ambulatório 19 isolados na enfermaria 05 isolados na UTI	07 isolados de Urina
					01 isolado de Secreção Uretral
					02 isolados de Sangue
					01 isolado de Secreção de Ferida
					07 isolados de Ponta de Cateter
					01 isolado de Secreção de Cateter
					03 isolados de Secreção de Ferida Operatória
					02 isolados de Fragmento Ósseo
					03 isolados de Secreção Traqueal
					03 isolados de Secreção de Úlcera
					01 isolado de Fragmento de Tecido de Ferida Operatória
					02 isolados de Cultura de Orofaringe
					01 isolado de Exsudado Purulento do Antebraço
01 isolado de Secreção Ocular					
<b>Perfil 2</b>	<b>800</b>	39	48,75	17 isolados no ambulatório 22 isolados na enfermaria	10 isolados de Urina
					01 isolado de Secreção Uretral
					02 isolados de Secreção Vaginal
					01 isolado de Esperma
					05 isolados de Ponta de Cateter
					01 isolado de Secreção de Prótese
					02 isolados de Fragmento de Tecido
					03 isolados de Secreção de Ferida Operatória
					01 isolado de Sangue
					01 isolado de Secreção Ocular
					01 isolado de Abscesso da Coxa
					01 isolado de Cultura de Tecido de Ferida Operatória
					01 isolado de Cultura de Secreção de Cavidade de Tíbia
					01 isolado de Secreção Nasal
					02 isolados de Ponta de Dreno
01 isolado de Secreção de Abscesso Joelho					
01 isolado de Coleção Abdominal					
01 isolado de Secreção de Axila					
01 isolado de Secreção de Fístula Direita					



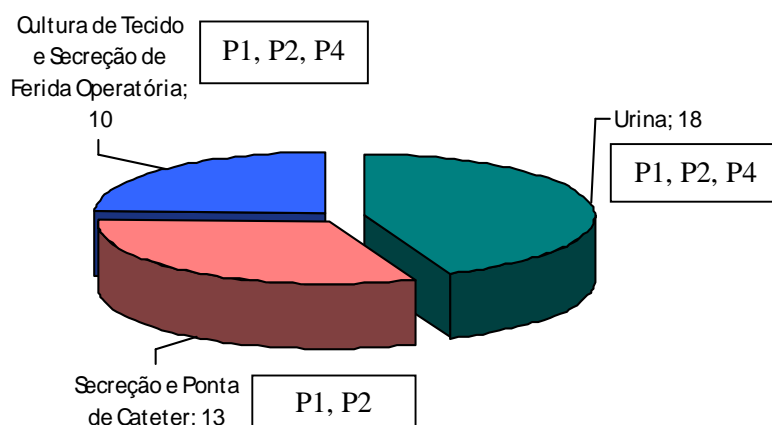
**Tabela 6.** Resultados da PCR do gene *coa* de *S. aureus* isolados de amostras clínicas em um hospital público do Recife-PE. (Conclusão)

					01 isolado de Secreção de Lesão Frontal 01 isolado de Fragmento Ósseo de Quadril
<b>Perfil 3</b>	<b>900</b>	01	1,25	01 isolado na enfermaria	01 isolado de Secreção de Dreno Torácico
<b>Perfil 4</b>	<b>1000</b>	05	6,25	03 isolados no ambulatório 02 isolados na enfermaria	01 isolado de Urina 01 isolado de Cultura de Ferida Operatória 01 isolado de Secreção de Orofaringe 01 isolado de Secreção de Ferida Operatória 01 isolado de Nasoorofaringe

(a) – número aproximado em pb

Fonte: Dados elaborados pelo próprio autor.

Neste estudo, os sítios de infecção mais frequentes onde foram isolados os *S. aureus* foram: urina (18 isolados), distribuídos em três coagulotipos: P1, P2 P4, com predominância de P2; cultura de tecido e secreção de ferida operatória (10 isolados), distribuídos em três coagulotipos: P1, P2, P4, com predominância de P1 e P2; secreção e ponta de cateter (13 isolados), distribuídos em dois coagulotipos P1e P2, com predominância de P1. Os perfis 1 e 2 foram observados nos isolados oriundos dos principais sítios de infecção. O perfil 3 não foi observado em isolados presentes nestes sítios de infecção por estar presente em apenas um isolado proveniente de secreção de dreno torácico (Figura 22, Tabela 6).



**Figura 22.** Sítios mais frequentes de infecção por *S. aureus* e os coagulotipos relacionados.  
Fonte: Dados elaborados pelo próprio autor.

A produção da coagulase é uma característica fenotípica amplamente empregada na identificação de *S. aureus*. A região 3'-terminal do gene *coa* contém seqüências curtas repetidas em tandem de 81 pb que permitem diferenciar isolados de *S. aureus* pelo número das seqüências repetidas e pela localização de sítios de restrição (GOH et al., 1992; AARESTRUP; DANGLE; SORDILLO, 1995).

De um modo geral, foram analisados quatro coagulotipos, dos quais três (P1, P2 e P4) estavam distribuídos em isolados da enfermaria e do ambulatório. Em isolados da enfermaria foram observados os quatros coagulotipos encontrados neste estudo (P1, P2, P3 e P4), demonstrando a presença de isolados portadores de todos os coagulotipos circulando neste setor. Nos isolados do ambulatório foram verificados três coagulotipos (P1, P2 e P4), evidenciando a presença desses perfis neste setor. Nos isolados da UTI apenas um coagulotipo foi encontrado (P1), porém isolados com esse mesmo coagulotipo também foram verificados no ambulatório e na enfermaria, sugerindo a circulação das cepas comportando esse perfil nos três setores do hospital. A maioria dos coagulotipos foi observada na

enfermaria e no ambulatório, no qual um destes encontrava-se na UTI também, indicando uma dispersão clonal dos isolados dentro do ambiente hospitalar estudado, podendo ser responsáveis por infecções nosocomiais neste hospital (Tabela 6). Nos sítios de infecção mais freqüentes, houve predominância dos perfis 1 e 2, por serem os coagulotipos mais comumente encontrados (Tabela 6).

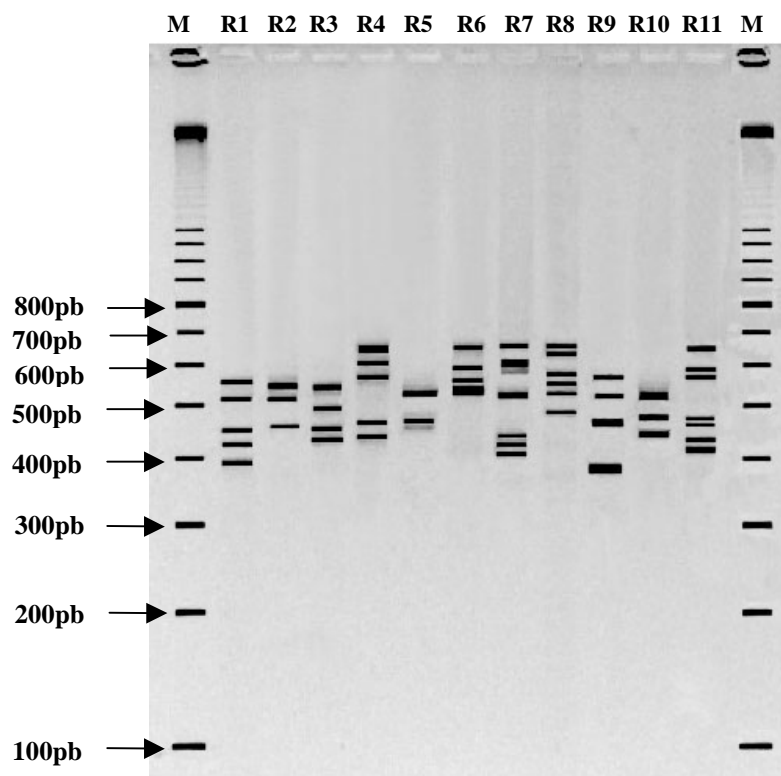
De acordo com Silveira-Filho et al. (2005), a amplificação por PCR do gene *coa* em 27 *S. aureus* isolados de vacas com mastite subclínica e de equipamento de ordenha produziu dois perfis genotípicos. Dessa forma, os isolados foram distribuídos em dois coagulotipos, de acordo com o tamanho do segmento amplificado (P1=750 pb e P2=1000 pb). A maioria dos isolados (85,18%) amplificou um fragmento de 1000 pb (P2). Este perfil foi encontrado nas duas propriedades analisadas. O perfil P1 foi observado em apenas quatro isolados (14,82%).

Nesta mesma pesquisa, foi determinada a presença de dois clones numa mesma propriedade, a dispersão de um mesmo clone em duas propriedades e um mesmo clone procedente do equipamento de ordenha. Os resultados obtidos no estudo sugerem a existência da relação entre a presença dos diferentes clones, o manejo-higiênico sanitário e o sistema de criação adotado nas propriedades analisadas.

A análise do polimorfismo do gene da coagulase foi utilizado com sucesso em diversos estudos epidemiológicos de *S. aureus* (RAIMUNDO et al., 1999; MONTESINOS et al., 2002). Porém, alguns trabalhos encontraram limitação no uso desta técnica, obtendo resultados pouco discriminatórios, sugerindo sua associação a outros métodos de tipagem (SCHWARZKOPF; KARCH, 1994; SHOPSIN et al., 2000). Neste estudo, a tipagem dos isolados através do gene da coagulase foi satisfatório, produzindo quatro coagulotipos distribuídos entre os setores do hospital estudado, permitindo acompanhar a dispersão dos *S. aureus* nos diferentes setores do hospital.

### **8.3 Tipagem molecular dos isolados clínicos de *S. aureus* pela ribotipagem-PCR**

Nas reações de ribotipagem-PCR, foram observados de 3 a 7 fragmentos de tamanho aproximado de 390 a 680 pb. Com base nos padrões de amplificação, os 80 isolados foram classificados em 11 ribotipos, denominados neste trabalho de R1 a R11 (Figura 23).



**Figura 23.** Perfis eletroforéticos representativos da ribotipagem-PCR de 80 isolados de *S. aureus* oriundos de amostras clínicas.

Fonte: Dados elaborados pelo próprio autor.

Nota: Marcador de peso molecular (100pb DNA *ladder*), linha M. Ribotipos 1 a 11 (R1-R11).

O polimorfismo observado nas regiões intergênicas 16S-23S dentro dos operons ribossomais pelo acúmulo de mutações pontuais, presença ou ausência de genes de tRNAs, permite discriminar as linhagens bacterianas (KOSTMAN et al., 1992).

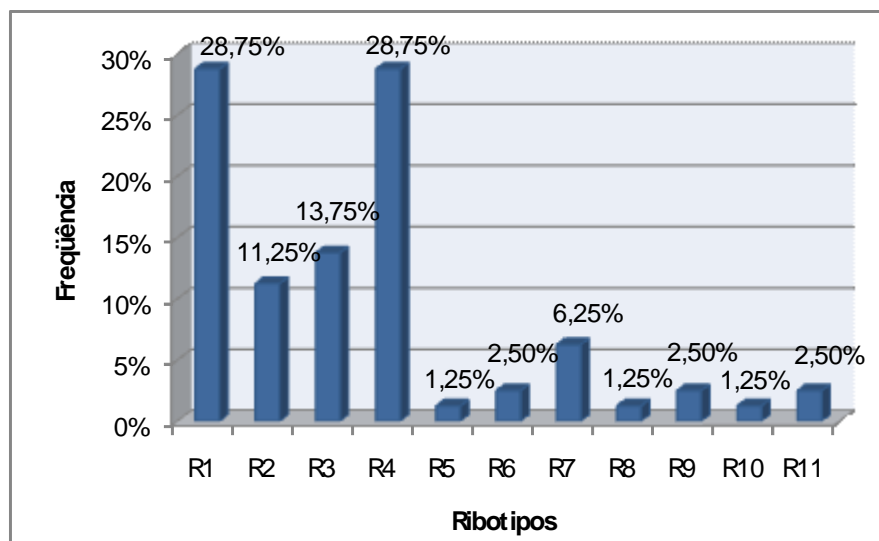
Neste estudo, os ribotipos mais comuns observados entre os isolados analisados foram R1 e R4 presentes em 28,75% dos isolados. Os isolados que comportavam o R1 encontravam-se distribuídos tanto no ambulatório quanto na enfermaria, sendo mais freqüente na enfermaria. O ribotipo R4 foi observado no ambulatório, na enfermaria e na Unidade de Tratamento Intensivo (UTI), no entanto, com maior freqüência na enfermaria. Este ribotipo foi o único encontrado na UTI.

O R3 foi observado em 13,75% dos isolados, distribuídos no ambulatório e na enfermaria, exibindo maior freqüência na enfermaria. O R2 (11,25% das amostras) também foi encontrado no ambulatório e na enfermaria, contudo apresentou maior freqüência no ambulatório, e o R7 (6,25% das amostras) também foi encontrado na enfermaria e no ambulatório. Os ribotipos R5, R6, R8, R9, R10 e R11 foram encontrados apenas em um ou dois isolados e foram exclusivos de determinado setor do hospital (ambulatório ou

enfermaria), com exceção do R9 encontrado no ambulatório e na enfermaria (Figura 24 e Tabela 7).

Em resumo, dos 11 ribotipos encontrados, seis (R1, R2, R3, R4, R7 e R9) foram observados em isolados presentes na enfermaria e no ambulatório. Na enfermaria foram observados nove ribotipos diferentes (R1, R2, R3, R4, R7, R8, R9, R10, R11), demonstrando a presença de nove diferentes isolados circulando neste setor do hospital. No ambulatório foi observada a presença de oito ribotipos (R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7, R9), demonstrando a presença de oito diferentes isolados presentes neste setor. Na UTI apenas um ribotipo foi encontrado, no entanto, este ribotipo foi observado também no ambulatório e na enfermaria, indicando a circulação destes isolados nos três setores do hospital.

Os resultados obtidos demonstraram uma dispersão clonal dos isolados dentro deste ambiente hospitalar estudado, podendo ser responsáveis por infecções nosocomiais neste hospital.



**Figura 24.** Frequências dos perfis eletroforéticos representativos da ribotipagem-PCR. Fonte: Dados elaborados pelo próprio autor.

**Tabela 7.** Ribotipos, sítios de infecção e distribuição de *S. aureus* no hospital.

(Continua)

<b>Ribotipos</b>	<b>N<sup>o</sup> de isolados</b>	<b>(%)</b>	<b>Distribuição dos isolados de <i>S. aureus</i> no hospital</b>	<b>Sítio de infecção</b>
<b>R1</b>	23	28,75	09 isolados no ambulatório 14 isolados na enfermaria	07 isolados de Urina 01 isolado de Secreção Vaginal 04 isolados de Ponta de Cateter 02 isolados de Fragmento de Tecido 03 isolados de Secreção de Ferida Operatória 01 isolado de Abscesso da Coxa 01 isolado de Cultura de Tecido de Ferida Operatória 01 isolado de Ponta de Dreno 01 isolado de Fragmento Ósseo de Quadril 01 isolado de Secreção Fístula Direita 01 isolado de Secreção Lesão Frontal
<b>R2</b>	09	11,25	06 isolados no ambulatório 03 isolados na enfermaria	02 isolados de Urina 01 isolado de Secreção Uretral 01 isolado de Sangue 01 isolado de Secreção de Orofaringe 01 isolado de Secreção de Abscesso Joelho 01 isolado de Secreção de Axila 01 isolado de Secreção de Ferida Operatória 01 isolado de Nasoorofaringe
<b>R3</b>	11	13,75	03 isolados no ambulatório 08 isolados na enfermaria	02 isolados de Urina 02 isolados de Secreção Ocular 01 isolado de Cultura de Secreção de Cavidade de Tíbia 01 isolado de Secreção Nasal 01 isolado de Orofaringe 01 isolado de Cultura de Secreção de Úlcera 01 isolado de Ponta de Cateter 01 isolado de Secreção de Cateter 01 isolado de Sangue

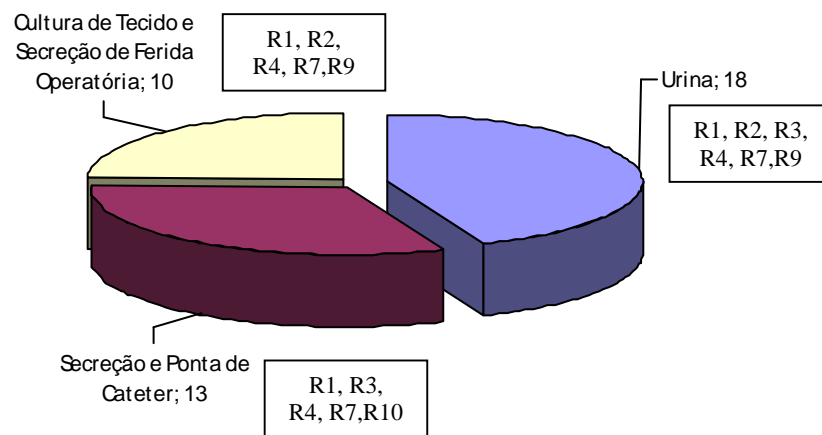
**Tabela 7.** Ribotipos, sítios de infecção e distribuição de *S. aureus* no hospital.

(Conclusão)

<b>R4</b>	23	28,75	05 isolados no ambulatório 13 isolados na enfermaria 05 isolados na UTI	05 isolados de Urina 01 isolado de Sangue 02 isolados de Fragmento Ósseo 03 isolados de Secreção Traqueal 02 isolados de Secreção de Úlcera 05 isolados de Secreção de Úlcera 01 isolado de Secreção de Dreno Torácico 01 isolado de Fragmento de Tecido de Ferida Operatória do Antebraço 01 isolado de Exsudado Purulento do Antebraço 02 isolados de Secreção Ferida Operatória
<b>R5</b>	01	1,25	01 isolado no ambulatório	01 isolado de Secreção Vaginal
<b>R6</b>	02	2,5	02 isolados no ambulatório	01 isolado de Esperma 01 isolado de Cultura de Orofaringe
<b>R7</b>	05	6,25	04 isolados no ambulatório 01 isolado na enfermaria	01 isolado de Secreção Uretral 01 isolado de Urina 01 isolado de Secreção Ferida 01 isolado de Ponta de Cateter 01 isolado de Secreção de Ferida Operatória
<b>R8</b>	01	1,25	01 isolado na enfermaria	01 isolado de Secreção de Prótese
<b>R9</b>	02	2,5	01 isolado no ambulatório 01 isolado na enfermaria	01 isolado de Urina 01 isolado de Cultura de Ferida Operatória
<b>R10</b>	01	1,25	01 isolado na enfermaria	01 isolado de Ponta de Cateter
<b>R11</b>	02	2,5	02 isolados na enfermaria	01 isolado de Ponta de Dreno 01 isolado de Coleção Abdominal

Fonte: Dados elaborados pelo próprio autor.

Os sítios de infecção onde foram isolados os *S. aureus* mais frequentes neste estudo foram: urina (18 isolados), distribuídos em seis ribotipos: R1, R2, R3, R4, R7, R9, com predominância de R1; cultura de tecido e secreção de ferida operatória (10 isolados), distribuídos em cinco ribotipos: R1, R2, R4, R7, R9, com predominância de R1; secreção e ponta de cateter (13 isolados), distribuídos em cinco ribotipos R1, R3, R4, R7, R10, com predominância de R4. O R1, R4 e R7 foram observados em todos os principais sítios de infecção. Os ribotipos R5, R6, R8 e R11 não foram observados nestes sítios de infecção, provavelmente por estarem distribuídos num menor número de isolados (Figura 25 e Tabela 7).



**Figura 25.** Sítios mais frequentes de infecção por *S. aureus* e os ribotipos relacionados.  
Fonte: Dados elaborados pelo próprio autor.

Em estudo realizado por Silveira-Filho (2007), foram analisados, através da ribotipagem-PCR, 94 isolados de *S. aureus* provenientes de leite bovino mastítico, equipamentos de ordenha e queijo tipo coalho oriundos de 11 propriedades dos municípios de São Bento do Una, Angelim, Caetés, Correntes e Gravatá, localizados na zona rural do Estado de Pernambuco, Brasil. Os isolados foram classificados em dez ribotipos, sendo o R1 mais comum e circulante entre todos os municípios analisados. De acordo com o estudo, as variações encontradas nos operons ribossomais constituem uma rica fonte de polimorfismo, que podem ser utilizadas de forma rápida e eficiente em investigações epidemiológicas.

De acordo com Pereira et al. (2002), foram analisados através da ribotipagem-PCR, 11 isolados de *S. aureus*, sendo seis isolados provenientes de vacas aparentemente saudáveis de fazendas do Estado da Paraíba, Brasil e cinco isolados oriundos de humanos no hospital da Universidade Federal da Paraíba, Brasil. Os isolados foram classificados em sete ribotipos, sendo R3 o mais frequente neste estudo e presente em dois isolados provenientes de humanos



e um isolado procedente de vaca. Foi verificado que três ribotipos incluíam isolados de origem humana e animal. As amostras foram de diferentes origens, sugerindo que alguns clones de *S. aureus* podem se propagar rapidamente.

Os resultados observados nas pesquisas citadas corroboram com o polimorfismo encontrado em nosso estudo, realizado com 80 isolados de amostras clínicas, distribuídos em 11 ribotipos, indicam uma rápida dispersão dos isolados nos setores do hospital, como também, comprovam que *S. aureus* permanece como um dos patógenos mais comuns em infecções sistêmicas de origem comunitária e hospitalar.

A técnica de ribotipagem-PCR tem a vantagem de ser menos propensa a variações, porque é específica e realizada sob condições de alta estringência. Neste estudo, esta técnica constituiu uma valiosa ferramenta na investigação das fontes de infecção por *S. aureus* em humanos, mostrando-se bastante vantajosa para o acompanhamento dos isolados nos diferentes ambientes hospitalares e, portanto uma valiosa ferramenta para epidemiologia molecular.

#### **8.4 Correlação entre a ribotipagem-PCR e polimorfismo do gene da coagulase (*coa*) em *S. aureus***

Nesta pesquisa, foi realizada uma correlação entre a ribotipagem-PCR e a PCR do gene *coa* e foi observada uma subtipagem dos coagulotipos. O coagulotipo 1 (P1) foi distribuído entre os ribotipos R2, R3, R4, R6, R7; o coagulotipo 2 (P2) foi distribuído entre os ribotipos R1, R2, R3, R5, R6, R8, R9, R10, R11; o coagulotipo 4 (P4) foi distribuído entre os ribotipos R2, R3, R9. O coagulotipo 3 (P3) mostrou relação apenas com o ribotipo R4, pois só um isolado exibiu este coagulotipo. Os ribotipos R1, R7 e R11 apresentaram relação direta com os coagulotipos P2, P1 e P2, respectivamente (Tabela 8 e 10).

Todos os cinco isolados oriundos da UTI apresentaram o mesmo coagulotipo (P1) e o mesmo ribotipo (R4), além de apresentarem apenas o gene *seg*, com exceção do isolado Sa 20 isolada na UTI, que não comportou nenhum gene toxigênico. Este último dado sugere que apenas um clone de *S. aureus* encontra-se localizado na UTI, no entanto distribuído também no ambulatório e na enfermaria, visto que o coagulotipo (P1) e o ribotipo (R4) foram observados em todos os setores do hospital, demonstrando a circulação deste isolado em todo o ambiente hospitalar (Tabela 10).

Dessa forma, o polimorfismo da região 16S-23S dos operons ribossomais foi mais discriminatório que a análise do gene *coa*. No entanto a associação entre as técnicas de tipagem mostrou-se necessária para uma caracterização mais aprofundada da heterogeneidade genética de *S. aureus*, isolados de amostras clínicas no hospital estudado.

É necessário compreender a epidemiologia da infecção para o seu controle efetivo e para o estabelecimento de medidas de prevenção. Embora nem todas as infecções adquiridas em hospitais sejam evitáveis, dados obtidos nos últimos anos mostraram que pelo menos um terço dos casos poderiam ser evitados. A prevenção e o controle dessas infecções consistem, sobretudo, na integração de atividades tais como: vigilância epidemiológica; controle do estado geral do paciente; procedimentos diagnósticos e terapêuticos; métodos de desinfecção, esterilização e lavagem de mãos. Esses cuidados incluem praticamente todas as rotinas hospitalares (SANTOS-FILHO, 2003).

**Tabela 8.** Coagulotipos e ribotipos relacionados em *S. aureus*.

Coagulotipos	Nº de isolados	Ribotipos
<b>P1</b>	01	R2
	06	R3
	22	R4
	01	R6
	05	R7
<b>P2</b>	23	R1
	05	R2
	04	R3
	01	R5
	01	R6
	01	R8
	01	R9
	01	R10
	02	R11
<b>P3</b>	01	R4
<b>P4</b>	03	R2
	01	R3
	01	R9

Fonte: Dados elaborados pelo próprio autor.

### 8.5 Correlação entre os genes toxigênicos e a produção da coagulase em *S. aureus*

Um dos principais indicadores de patogenicidade e enterotoxigenicidade de *S. aureus* é a produção da coagulase, embora ainda não seja claro o seu papel como fator de virulência (SU et al., 1999; UDO et al., 1999; SILVA et al., 2005).

Todos os isolados de *S. aureus* foram positivos para a produção de coagulase através da prova bioquímica realizada e todos possuem o gene da coagulase com diferentes perfis. Neste estudo não houve correlação entre a produção da coagulase e o perfil dos genes enterotoxigênicos em *S. aureus*, pois foi verificado o mesmo perfil enterotoxigênico nos quatro coagulotipos (Tabela 9).

O perfil 1 apresentou relação com os genótipos: *seg*, *seg+sea*, *seg+seb*, *seg+seh*, *seg+eta*, *seg+sea+seh*, *seg+sea+seb+seh*. O genótipo mais freqüente foi *seg* presente em 26/35 (74,3%) dos isolados que exibiram este perfil e apenas um isolado não apresentou genes toxigênicos. O perfil 2 apresentou relação com os genótipos: *seg*, *seg+sea*, *seg+seb*, *seg+sec*, *seg+seh*, *seg+tst*, *seg+sec+tst*. O genótipo mais freqüente também foi *seg* presente em 26/39 (66,7%) dos isolados. Um único isolado exibiu o perfil 3, que apresentou relação com o gene *seg*. O perfil 4 apresentou relação com os genótipos: *seg*, *seg+seb*, *seg+seh*, sendo o genótipo *seg* mais freqüente, presente em 03/05 (60%) dos isolados (Tabela 9 e 10).

Em resumo, todos os isolados produtores da enzima coagulase apresentaram de uma a quatro toxinas, com exceção do isolado Sa20 que não apresentou nenhum dos genes toxigênicos estudados (Tabela 10), demonstrando ampla distribuição entre a produção de coagulase e a presença de genes toxigênicos.

**Tabela 9.** Coagulotipos e genes toxigênicos relacionados em *S. aureus*.

Coagulotipos	Nº de isolados	Genes toxigênicos
	26	<i>seg</i>
<b>Perfil 1</b>	01	<i>seg+sea</i>
	01	<i>seg+seb</i>
	01	<i>seg+seh</i>
	01	<i>seg+eta</i>
	03	<i>seg+sea+seh</i>
	01	<i>seg+sea+seb+seh</i>
	01	-
	26	<i>seg</i>
<b>Perfil 2</b>	04	<i>seg+sea</i>
	01	<i>seg+seb</i>
	01	<i>seg+sec</i>
	04	<i>seg+seh</i>
	01	<i>seg+tst</i>
	02	<i>seg+sec+tst</i>
	01	<i>seg</i>
<b>Perfil 4</b>	03	<i>seg</i>
	01	<i>seg+seb</i>
	01	<i>seg+seh</i>

Fonte: Dados elaborados pelo próprio autor.

**Tabela 10.** Exotoxinas, coagulotipos, ribotipos, sítios de infecção e distribuição do *S. aureus* no hospital.

(Continua)

<i>S.aureus</i> isolados	Sítio de Infecção	Distribuição no hospital	<i>sea</i>	<i>seb</i>	<i>sec</i>	<i>seg</i>	<i>seh</i>	<i>eta</i>	<i>tst</i>	Coagulotipos	Ribotipos
Sa1	Urina	Ambulatório	-	-	-	+	+	-	-	P2	R1
Sa2	Secreção Uretral	Ambulatório	-	-	-	+	-	-	-	P2	R2
Sa3	Secreção Vaginal	Ambulatório	-	-	+	+	-	-	-	P2	R1
Sa4	Urina	Ambulatório	-	-	-	+	+	-	-	P2	R3
Sa5	Urina	Ambulatório	-	-	-	+	+	-	-	P2	R1
Sa6	Urina	Ambulatório	-	-	-	+	-	-	-	P1	R4
Sa7	Urina	Ambulatório	-	-	-	+	-	-	-	P1	R4
Sa8	Secreção Vaginal	Ambulatório	-	-	+	+	-	-	+	P2	R5
Sa9	Eesperma	Ambulatório	-	-	-	+	-	-	-	P2	R6
Sa10	Secreção Uretral	Ambulatório	+	-	-	+	+	-	-	P1	R7
Sa11	Ponta de Cateter	Enfermaria	-	-	-	+	-	-	-	P2	R1
Sa12	Urina	Ambulatório	-	-	-	+	-	-	-	P2	R1
Sa13	Urina	Ambulatório	-	+	-	+	-	-	-	P2	R1
Sa14	Urina	Ambulatório	-	+	-	+	-	-	-	P4	R3
Sa15	Urina	Enfermaria	-	-	-	+	-	-	-	P2	R2
Sa16	Urina	Ambulatório	+	+	-	+	+	-	-	P1	R7
Sa17	Urina	Ambulatório	-	-	-	+	-	+	-	P1	R4
Sa18	Urina	Enfermaria	-	-	-	+	-	-	-	P1	R4
Sa19	Urina	Ambulatório	-	-	-	+	-	-	-	P1	R4
Sa20	Sangue	UTI	-	-	-	-	-	-	-	P1	R4
Sa21	Urina	Enfermaria	-	-	-	+	-	-	-	P2	R1
Sa22	Urina	Ambulatório	-	-	-	+	-	-	-	P1	R2
Sa23	Urina	Ambulatório	-	-	-	+	-	-	-	P2	R1
Sa24	Secreção de Prótese	Enfermaria	+	-	-	+	-	-	-	P2	R8
Sa25	Secreção de Ferida	Ambulatório	+	-	-	+	+	-	-	P1	R7
Sa26	Ponta de Cateter	Enfermaria	+	-	-	+	+	-	-	P1	R7
Sa27	Secreção de Ferida Operatória	Ambulatório	+	-	-	+	-	-	-	P1	R7
Sa28	Urina	Ambulatório	-	-	-	+	-	-	-	P2	R9
Sa29	Urina	Enfermaria	-	-	-	+	-	-	-	P2	R1
Sa30	Fragmento de Tecido	Enfermaria	-	-	-	+	-	-	-	P2	R1
Sa31	Fragmento Ósseo Tíbia	Enfermaria	-	-	-	+	-	-	-	P1	R4
Sa32	Ponta de Cateter	Enfermaria	-	-	+	+	-	-	+	P2	R10
Sa33	Secreção de Ferida Operatória	Enfermaria	-	-	-	+	-	-	-	P2	R1

**Tabela 10.** Exotoxinas, coagulotipos, ribotipos, sítios de infecção e distribuição do *S. aureus* no hospital.

(Continuação)

<i>S.aureus</i> isolados	Sítio de Infecção	Distribuição no hospital	<i>sea</i>	<i>seb</i>	<i>sec</i>	<i>seg</i>	<i>seh</i>	<i>eta</i>	<i>tst</i>	Coagulotipos	Ribotipos
Sa34	Sangue	Ambulatório	-	-	-	+	-	-	-	P2	R2
Sa35	Secreção Ocular	Enfermaria	+	-	-	+	-	-	-	P2	R3
Sa36	Secreção Traqueal	UTI	-	-	-	+	-	-	-	P1	R4
Sa37	Secreção de Úlcera	Enfermaria	-	-	-	+	-	-	-	P1	R4
Sa38	Fragmento Ósseo	Enfermaria	-	-	-	+	-	-	-	P1	R4
Sa39	Ponta de Cateter	Enfermaria	-	-	-	+	-	-	-	P1	R4
Sa40	Abscesso da Coxa	Enfermaria	-	-	-	+	-	-	-	P2	R1
Sa41	Cultura de Tecido de Ferida Operatória	Enfermaria	-	-	-	+	-	-	-	P2	R1
Sa42	Cultura de Secreção de Cavidade de Tíbia	Enfermaria	+	-	-	+	-	-	-	P2	R3
Sa43	Ponta de Cateter	Enfermaria	-	-	-	+	-	-	-	P1	R4
Sa44	Cultura de Ferida Operatória	Enfermaria	-	-	-	+	-	-	-	P4	R9
Sa45	Secreção de Dreno Torácico	Enfermaria	-	-	-	+	-	-	-	P3	R4
Sa46	Cultura de Orofaringe	Ambulatório	-	-	-	+	-	-	-	P1	R6
Sa47	Ponta de Cateter	UTI	-	-	-	+	-	-	-	P1	R4
Sa48	Secreção de Úlcera	Ambulatório	-	-	-	+	-	-	-	P1	R4
Sa49	Secreção de Orofaringe	Ambulatório	-	-	-	+	-	-	-	P4	R2
Sa50	Secreção Nasal	Ambulatório	+	-	-	+	-	-	-	P2	R3
Sa51	Ponta de Cateter	Enfermaria	-	-	-	+	-	-	-	P2	R1
Sa52	Ponta de Cateter	Enfermaria	-	-	-	+	-	-	-	P1	R4
Sa53	Fragmento de Tecido de Ferida Operatória	Enfermaria	-	-	-	+	-	-	-	P1	R4
Sa54	Ponta de Cateter	Enfermaria	-	-	-	+	-	-	-	P2	R1
Sa55	Secreção Traqueal	UTI	-	-	-	+	-	-	-	P1	R4
Sa56	Ponta de Dreno	Enfermaria	-	-	-	+	-	-	-	P2	R1
Sa57	Exsudado Purulento do Antebraço	Enfermaria	-	-	-	+	-	-	-	P1	R4
Sa58	Fragmento Ósseo de Quadril	Enfermaria	-	-	-	+	-	-	-	P2	R1
Sa59	Secreção de Ferida Operatória	Enfermaria	-	-	-	+	-	-	-	P2	R1
Sa60	Secreção de Ferida (Transplante)	Enfermaria	-	-	-	+	-	-	-	P1	R4
Sa61	Ponta de Dreno	Enfermaria	-	-	-	+	-	-	-	P2	R11
Sa62	Secreção de Abscesso Joelho	Enfermaria	-	-	-	+	+	-	-	P2	R2
Sa63	Ponta de Cateter	Enfermaria	-	-	-	+	-	-	-	P1	R4
Sa64	Coleção Abdominal	Enfermaria	-	-	-	+	-	-	-	P2	R11
Sa65	Orofaringe	Enfermaria	-	-	-	+	+	-	-	P1	R3
Sa66	Secreção Traqueal	UTI	-	-	-	+	-	-	-	P1	R4
Sa67	Secreção de Ferida Operatória	Enfermaria	-	-	-	+	-	-	-	P1	R4
Sa68	Cultura de Secreção de Úlcera	Enfermaria	-	+	-	+	-	-	-	P1	R3
Sa69	Tecido Superficial e Tecido Profundo	Enfermaria	-	-	-	+	-	-	-	P2	R1

**Tabela 10.** Exotoxinas, coaglotipos, ribotipos, sítios de infecção e distribuição do *S. aureus* no hospital.

(Conclusão)

<i>S. aureus</i> isolados	Sítio de Infecção	Distribuição no hospital	<i>sea</i>	<i>seb</i>	<i>sec</i>	<i>seg</i>	<i>seh</i>	<i>eta</i>	<i>tst</i>	Coaglotipos	Ribotipos
<b>Sa70</b>	Secreção de Axila	Ambulatório	-	-	-	+	-	-	-	P2	R2
<b>Sa71</b>	Secreção de Fístula Direita	Ambulatório	-	-	-	+	-	-	-	P2	R1
<b>Sa72</b>	Secreção de Ferida Operatória	Enfermaria	-	-	-	+	+	-	-	P4	R2
<b>Sa73</b>	Ponta de Cateter	Enfermaria	-	-	-	+	-	-	-	P1	R3
<b>Sa74</b>	Secreção de Cateter	Enfermaria	-	-	-	+	-	-	-	P1	R3
<b>Sa75</b>	Sangue	Enfermaria	-	-	-	+	-	-	-	P1	R3
<b>Sa76</b>	Secreção de Lesão Frontal	Ambulatório	-	-	-	+	-	-	-	P2	R1
<b>Sa77</b>	Secreção Ocular	Enfermaria	-	-	-	+	-	-	-	P1	R3
<b>Sa78</b>	Nasoorofaringe	Ambulatório	-	-	-	+	-	-	-	P4	R2
<b>Sa79</b>	Ponta de Cateter	Enfermaria	-	-	-	+	-	-	-	P2	R1
<b>Sa80</b>	Secreção de Ferida Operatória	Ambulatório	-	-	-	+	-	-	+	P2	R1

Fonte: Dados elaborados pelo próprio autor.

## 9 CONCLUSÕES

A partir da análise das exotoxinas, do polimorfismo da região 3' terminal do gene da coagulase (*coa*) e das regiões espaçadoras intergênicas (ITSs) do rDNA 16S-23S dos isolados de *S. aureus* de origem hospitalar, conclui-se que:

- Neste estudo foi observada uma alta frequência dos genes toxigênicos (*sea*, *seb*, *sec*, *seg*, *seh*, *eta* e *tst*) nos *S. aureus* isolados de amostras clínicas, sendo o gene *seg* o mais frequente entre os isolados de *S. aureus* estudados, representando potencial risco para a saúde pública.
- Os isolados de *S. aureus* apresentaram grande polimorfismo genético considerando o número de amostras estudadas, o número de ribotipos e coagulotipos identificados;
- A ribotipagem - PCR e a PCR do gene da coagulase, mostraram-se ferramentas úteis na tipagem de *S. aureus* de diferentes origens, pois foi possível verificar uma ampla dispersão dos isolados estudados entre os setores do hospital (ambulatório, enfermaria e UTI);
- Não houve correlação dos coagulotipos e os genes toxigênicos, já que o mesmo perfil toxigênico foi observado nos diferentes coagulotipos.



**REFERÊNCIAS**

- 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. 2, p. 124-128, 1995.
- AARESTRUP, F. M.; SCOTT, N. L.; SORDILLO, L. M. Ability of *Staphylococcus aureus* coagulase genotypes to resist neutrophil bactericidal activity and phagocytosis. **Infection and Immunity**, Washington, v. 62, p. 5679-5682, 1994.
- AKINEDEN, Ö. et al. Toxin genes and other characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from milk of cows with mastitis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Washington, v. 8, p. 959-964, 2001.
- ALBERTS, B. et al. **Biologia Molecular da Célula**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.
- ALCARAZ, L. E. et al. Detección de *Staphylococcus aureus* spp. en manipuladores de alimentos. **La Alimentación Latino Americana**, v. 31, 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. Aspectos epidemiológicos da mastite bovina. In: ENCONTRO DE PESQUISADORES EM MASTITES, 1999, Botucatu. **anais**. Botucatu: UNESP, 1999, p. 19-26.
- ARSLAN, S.; ÖZKARDES, F. Slime production and antibiotic susceptibility in staphylococci isolated from clinical samples. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 102, p. 29-33, 2007.
- BAIRD-PARKER, A. C. The *Staphylococci*: an introduction. **Journal of Applied Bacteriology**: Supplement, Oxford, v.19, p. 1S-8S, 1990.
- BAKER, M. D.; ACHARYA, R. Superantigens: structure-function relationships. **International Journal of Medical Microbiology**, Jena, v. 293, p. 529-537, 2004.
- BALABAN, N.; RASOOLY, A. Staphylococcal Enterotoxins. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 61, p. 01-10, 2000.

BANIA, J. et al. The profiles of enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* from nasal carriers. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 42, p. 315-320, 2006.

BASELGA, R. et al. Phase variation of slime production in *Staphylococcus aureus* implications in colonization and virulence. **Infection and Immunity**, Washington, v. 61, p. 4857-4862, 1993.

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

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. et al. Understanding the physiology and adaptation of staphylococci: a post-genomic approach. : **International Journal of Medical Microbiology**, Jena, v. 297, p. 483-501, 2007.

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

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

BERGDOLL, M. S. et al. A new staphylococcal enterotoxin, enterotoxin F, associated with the toxic shock syndrome *Staphylococcus aureus* isolates. **Lancet**, London, v.1, p. 1017-1021, 1981.

BERGDOLL, M.S. *Staphylococcus aureus*. In: **FOODBORNE BACTERIAL PATHOGENS**, 1989, New York. **Marcell Dekker**. New York, 1989, p. 463-523.

BERKE, A.; TILTON, R. C. Evaluation of rapid coagulase methods for the identification of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 23, p. 916-919, 1986.

BERNARDO, W. L. C. et al. *Staphylococcus aureus* ampicillin-resistant from the odontological clinic environment. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v.47, p. 19-24, 2005.

BES, M. et al. Population diversity of *Staphylococcus intermedius* isolates from various host species: typing by 16S-23S intergenic ribosomal DNA spacer polymorphism analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 40, p. 2275-2277, 2002.

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

BETLEY, M. J.; MEKALANOS, J. J. Staphylococcal enterotoxin A is encoded by phage. **Science**, Washington, v. 229, p. 185-187, 1985.

BEZANSON, G.; MACDONALD, J.; DREBOT, M. Polymorphism in ribosome spacer DNA *amplicons* permit differentiation of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. In: INTERSCIENCE CONFERENCE ON ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, 35, 1995, Washington, **anais...**, Washington, American Society for Microbiology, 1995, p. 283.

BLYTH, M.; ESTELA, C.; YOUNG, A. E. R. Severe staphylococcal scalded skin syndrome in children. **Burns**, Oxford, v. 34, p. 98-103, 2007.

BOERLIN, P. et al. Methods for identification of *Staphylococcus aureus* isolates in cases of bovine mastitis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 41, p. 767-771, 2003.

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**, New York, v. 209, p. 15-20, 1987.

BROWN, T. A. **Genética, um enfoque molecular**: Estudo de genes clonados. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

CARMO, L. S. et al. Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in minas cheese and raw milk in Brazil. **Food Microbiology**, London, v. 14, p. 09-14, 2002.

CARMO, L. S.; BERGDOLL, M. S. Staphylococcal food poisoning in Belo Horizonte (Brazil). **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 21, p. 320-323, 1990.

CASEY, A. L.; LAMBERT, P. A.; ELLIOTT, T. S. J. Staphylococci. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v. 29, p. 23-32, 2007.

CASMAN, E. P. et al. Identification of a fourth staphylococcal enterotoxin, enterotoxin D. **Journal of Bacteriology**, Washington , v. 94, p. 1875-1882, 1967.

CAVALCANTI, S. M. M. et al. Estudo comparativo de *Staphylococcus aureus* importado para as unidades de terapia intensiva de hospital universitário, Pernambuco, Brasil. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, São Paulo, v. 9, p. 436-446, 2006.

CHEESBROUGH, M. **District laboratory practice in tropical countries** - Part 2. Cambridge: Cambridge University, 2000.

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.

CHRISTENSEN, G.D. et al. Colonial morphology of staphylococci on memphis agar. Phase variation of slime production, resistance to beta-lactam antibiotics and virulence. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 161, p. 1153-1169, 1990.

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

COBB, B. D.; CLARCKSON, J. M. A simple procedure for optimising the polymerase chain reaction (PCR) using modified Taguchi methods. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 22, p. 3801-3805, 1994.

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 the type E staphylococcal enterotoxin gene. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 170, p. 2954-2960, 1988.

CUCARELLA, C. et al. Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 183, p. 2888–2896, 2001.

CUNHA-NETO, A. **Enterotoxigenicidade de *Staphylococcus* spp. isolados de alimentos**, 1999. Dissertação (Mestrado) Departamento de Nutrição - Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 1999.

CUNHA-NETO, A.; SILVA C. G. M.; STAMFORD, T. L. M. *Staphylococcus* enterotoxigênicos em alimentos *in natura* e processados no estado de Pernambuco, Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 22, p. 263-271, 2002.

DAKIC, I. et al. Survey of genes encoding Staphylococcal enterotoxins, toxic shock syndrome toxin 1, and exfoliative toxin in members of the *Staphylococcus sciuri* group. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, p. 4875-4876, 2005.

DEGO, O. K.; VAN DIJK, J. E; NEDERBRAGT, H. Factors involved in the early pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis with emphasis on bacterial adhesion and invasion – a review. **Veterinary Quarterly**, The Hague, v. 24, p. 181-198, 2002.

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

EL-HUNEIDI, W.; BDOUR, S.; MAHASNEH, A. Detection of enterotoxin genes seg, seh, sei, and sej and of a novel aroA genotype in Jordanian clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, New York, v. 56, p.127 - 132, 2006.

ELLIOT, M. J. et al. Nasal carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among paramedics in the Sedgwick Medical Service in Wichita, Kansas. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, Thorofare, v. 23, p. 60-63, 2002.

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.

FARAH, S. B. **DNA Segredos e Mistérios**. São Paulo: Sarvier, 1997.

FISCHER, A. et al. A quantitative real-time immuno-PCR approach for detection of staphylococcal enterotoxins. **Journal of Molecular Medicine**, Berlin, v. 85, p. 461-469, 2007.

FITZGERALD, J. R. et al. Genome diversification in *Staphylococcus aureus*: molecular evolution of a highly variable chromosomal region encoding the staphylococcal exotoxin-like family of proteins. **Infection and Immunity**, Washington, v.71, p. 2827-2838, 2003.

FOGEL, G. B. et al. Prokaryotic genome size and SSU rDNA copy number: estimation of microbial relative abundance from a mixed population. **Microbial Ecology**, New York, v.38, p.93-113, 1999.

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

FRAZIER, W. C; WESHOFF, D. C. **Microbiologia de los Alimentos**. 4. ed. Zaragoza: Editorial Acribia, 2000.

FREITAS, M. F. L et al. Exotoxinas Estafilocócicas. **Ciência Veterinária Tropical**, 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, p. 171-177, 2005.

GELLI, D. S. et al. Surtos de enfermidades transmitidas por alimentos (ETAs) investigados pelos laboratórios de Saúde Pública do Estado de São Paulo, no período de 1994 a 1998. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 20, 1999, Salvador, **anais...** Salvador: [s. n.], 1999, p.126.

GILETTO, A.; FYFFE, J. G. A novel ELISA format for the rapid and sensitive detection of Staphylococcal enterotoxin A. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 62, p. 2217-2222, 1998.

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

GRIMONT, F.; GRIMONT, P. A. D. La Carte D'Identite moleculaire des bacteries. **Bulletin de La Societe Francese Microbiologic**, Paris, v. 6, p. 9-12, 1991.

GÜRTLER V.; BARRIE, H. D. Typing of *Staphylococcus aureus* strains by PCR-amplification of variable-length 16S-23S rDNA spacer regions: characterization of spacer sequences. **Microbiology**, New York, v. 41, p. 1255-1265, 1995.

HALL, J. C. **Manual of Skin Diseases**. 6. ed. Philadelphia: **Lippincot**, 1991.

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

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

IARIA, S. T. *Staphylococcus aureus* enterotoxigênico em doces cremosos vendidos em Municípios de São Paulo, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 15, p. 321-37, 1981.

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

JARRAUD, 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.

JENSEN, M. A.; WEBSTER, J. A.; STRAUS, N. Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction-amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 59, p. 945-952, 1993.

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, W. M. S. et al. Detection of genes for enterotoxins, exfoliative toxins, and toxic shock syndrome toxin 1 in *Staphylococcus aureus* by the polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 29, p. 426-430, 1991.

JORGENSEN, H. 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, 2005.

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

KAIDA, S. et al. Nucleotide sequence of the staphylocoagulase gene: its unique COOH-terminal 8 tandem repeats. **The Journal of Biochemistry**, Tokyo, v. 102, p. 1177-1186, 1987.

KAPUR, V. et al. Molecular population genetic analysis of *Staphylococcus aureus* recovered from cows. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 33, p. 376-380, 1995.

KENT STATE UNIVERSITY. **Microbiology**: Learning Center. Disponível em: <dept.kent.edu/microbiology/images/manitol2.jpg>. Acesso: 18 março 2008.

KIMICONTROL . *Staphylococcus aureus*. Disponível em: <[http://www.kimicontrol.com/edu-e.html#STAPHYLOCOCCUS\\_AUREUS](http://www.kimicontrol.com/edu-e.html#STAPHYLOCOCCUS_AUREUS)>. Acesso: 28 março 2008.

KLOSS, W. E.; LAMBE, J. R. *Staphylococcus*. In: BALOWS, A. **Manual of Clinical Microbiology**. 5. ed. Washington: American Society for Microbiology, 1991, 1500 p.

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.

KONEMAN, E.W. et al. Cocos Gram-Positivos: Parte I: Estafilococos e Microrganismos Relacionados. In: KONEMAN, E.W. et al. **Diagnóstico Microbiológico**: Texto e Atlas Colorido. 5. ed.. Rio de Janeiro: Medsi, 2001, p. 551-588.



KOSTMAN, J. R. et al. A universal approach to bacterial molecular epidemiology by polymerase chain reaction ribotyping. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 171, p. 204-298, 1995.

KOSTMAN, J. R. et al. Molecular epidemiology of *Pseudomonas cepacia* determined by polymerase chain reaction ribotyping. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 30, p. 2084-2087, 1992.

KUMARI, D. N. P. et al. Cookson B. Comparison and application of ribosome spacer DNA amplicon polymorphisms and pulsed-field gel electrophoresis for differentiation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 35, p. 881-885, 1997.

LACHICA, R. V. F.; HOEPRICE, P. D.; RIEMANN, H. P. Tolerance of staphylococcal thermonuclease to stress. **Applied Microbiology**, Washington, v. 23, p. 994-997, 1972.

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, p. 2050-2054, 2001.

LANGE, C. et al. Molecular subtyping of *Staphylococcus aureus* isolates from cases of bovine mastitis in Brazil. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.67, p.127-141, 1999.

LAWRENCE, C. et al. Use of the coagulase gene typing method for detection of carriers methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 37, p. 687-696, 1996.

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.

LETERTRE, C. et al. Identification of a new putative enterotoxin SEU encoded by *egc* cluster of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 2, p.

63-76, 2003.

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

LONCAREVIC, S. et al. 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.

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

MADISON, B. M.; BASELSKI, V. S. Rapid identification of *Staphylococcus aureus* in blood cultures by thermonuclease testing. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 18, p. 722-724, 1983.

MARTÍN, 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**. 4. ed., 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, p. 48-53, 2001.

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.

MIMS, C. A. et al. **Microbiologia Médica**. 2. ed., São Paulo: Manole Ltda, 1999.

MONTESINOS, I. et al. Epidemiologic genotyping of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis at a university hospital and comparison with antibiotyping and protein A and coagulase gene polymorphism.

**Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 40, p. 2119-2125, 2002.

MOSSEL, D. A. A.; GARCIA, M. B. **Microbiologia de los Alimentos**. Fundamentos ecológicos para garantizar y comprobar la inocuidad y la calidad de los alimentos. 1. ed., Zaragoza: Acribia, 1975.

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.

NÁJERA-SÁNCHEZ, G. et al. Development of two multiplex polymerase chain reactions for the detection of enterotoxigenic strains of *Staphylococcus aureus* isolated from foods. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.66, p. 1055-1062, 2003.

**NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION**. Taxonomy Browser. Disponível em: <[www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/)>. Acesso em: 20 dez. 2006.

OLIVE, D. M.; BEAN, P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 37, p. 1661-1669, 1999.

OLIVEIRA, A. M.; RAMOS, M. C. PCR-based ribotyping of *Staphylococcus aureus*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 35, p. 175-180, 2002.

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* ou *sei* genes. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 40, p. 857-862, 2002.

ORWIN, P. M. et al. Characterization of *Staphylococcus aureus* Enterotoxin L. **Infection and Immunity**, Washington, v. 71, p. 2916-2919, 2003.

ORWIN, P. M. et al. Biochemical and Biological Properties of Staphylococcal Enterotoxin K. **Infection and Immunity**, Washington, v. 69, p. 360-366, 2001.

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.

PARHAM, P. **O Sistema Imune**. Porto Alegre: Artmed, 2001.

PARSONNET, J. Case definition of staphylococcal TSS: A proposed revision incorporating laboratory finding. In: ARBUTHNOTT, J.; FURMAN, B. (Ed.). **European Conference on Toxic Shock Syndrome. International Congress and Symposium Series 229**. New York: Royal Society of Medicine, 1998.

PEREIRA, M. S. V. et al. Typing of human and bovine *Staphylococcus aureus* by RAPD and ribotyping-PCR. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 35, p. 32-36, 2002.

PERL, T. M. et al. Intranasal mupirocin to prevent postoperative *Staphylococcus aureus* infections. **New England Journal of Medicine**, Waltham, v. 346, p. 1871-1877, 2002.

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

PORTAL SÃO FRANCISCO. Furúnculo estafilocócico. Disponível em:  
<<http://www.colegiosaofrancisco.com.br/alfa/furunculo/imagens/furunculo-2.jpg>>.  
Acesso: 10 março 2008.

RAIMUNDO, O. et al. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* of bovine origin by polymorphisms of the *coagulase* gene. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 66, p. 275-284, 1999.

RAJAGOPALAN, G. et al. Acute systemic immune activation following vaginal exposure to staphylococcal enterotoxin B—Implications for menstrual shock. **Journal of Reproductive Immunology**, New York, v. 73, p. 51-59, 2007.

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, p. 130-133, 2004.

RAVEL, R. **Laboratório Clínico- Aplicações clínicas dos dados laboratoriais**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A, 1997.

REISS, M. A. Toxic shock syndrome. **Primary care update for Obstetricians and Gynecologists**, New York, v. 7, p. 85-90, 2000

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

RIBEIRO, J.; BOYCE, J. M.; ZANCANARO, P. Q. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) among patients visiting the emergency room at a tertiary hospital in Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, Salvador, v.9, p.52-55, 2005.

ROBERSON, J. R. et al. Evaluation of methods for differentiation of coagulase-positive staphylococci. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 30, p. 3217-3219, 1992.

RODRIGUES, K. L. et al. Intoxicação estafilocócica em restaurante institucional. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, 2004.

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. 25, p. 61-67, 2002.

RUZIN A.; LINDSAY, J.; NOVICK, R. P. Molecular genetics of SaPII- a mobile pathogenicity island in *Staphylococcus aureus*. **Molecular Microbiology**, Salem, 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 central Java in Indonesia and Hesse en Germany. **Journal of Veterinary Science**, Washington, v. 5, p. 103-109, 2004.

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 Napgama**, São Paulo, v. 6, p. 19-23, 2003.

SANTOS-FILHO, L. **Manual de Microbiologia Clínica**. 3. ed. João Pessoa: Ed. Universitária, 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, p. 3780-3785, 1994.

SCHAECHTER, M. et al. **Microbiologia: mecanismos das doenças infecciosas**. 3. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

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. Gram-positive cocci. Family I. *Micrococcaceae*. In: SNEATH, P. H. A.; MAIR, N. S.; SHARPE, M. E. (Eds). **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9. ed., Baltimore: William & Wilkins Co., 1986, p. 999-1032.

SCHOSKE, R. et al. Multiplex PCR design strategy used for the simultaneous amplification of 10Y chromosome short tandem repeat (STR) loci. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 375, p. 333-343, 2003.

SCHWARZKOPF, A.; KARCH, H. Genetic variation in *Staphylococcus aureus* coagulase genes and limits for use as epidemiological marker. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 32, p. 2407-2412, 1994.

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. Tese (Doutorado) - Escola Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2000.

SHARMA, N. K.; RESS, C. E. D.; 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, p. 1347-1353, 2000.

SHITTU, A.; LIN, J.; MORRISON, D.; KOLAWOLE, D. Identification and molecular characterization of mannitol salt positive, coagulase-negative staphylococci from nasal samples of medical personnel and students. **Journal of Medical Microbiology**,

London, v. 55: p. 317-324, 2006.

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, p. 3453-3456, 2000.

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.

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

SILVEIRA-FILHO, V. M. et al. Estudo epidemiológico molecular de *Staphylococcus aureus* associados à Mastite bovina provenientes do estado de Pernambuco, Brasil. **Revista Napgama**, São Paulo, v. 8, p. 12-17, 2005.

SIMON, S. S.; SANJEEV, S. Prevalence of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in fishery products and fish processing factory workers. **Food Control**, Guildford, v. 18, p. 1565-1568, 2006.

SOMMERÄUSER, J. et al. The epidemiology of *Staphylococcus aureus* infections from subclinical mastitis in dairy cows during a control programme. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.96, p.91-102, 2003.

SPICER, W. J. **Bacteriologia, Micologia e Parasitologia Clínica**. 1. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

STAMFORD, T. L. M. et al. Enterotoxigenicidade de *Staphylococcus* spp. Isolados de leite *in natura*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, p. 41-45, 2006.

STEVENS, D. L. et al. Impact of antibiotics on expression of virulence-associated exotoxin genes in methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 195, p. 202-211, 2007.

STRUELENS, M. J. et al. Epidemiologic typing and delineation of genetic relatedness of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by macrorestriction analysis of genomic DNA by using pulsed-field gel electrophoresis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.30, p. 2599-2605, 1992.

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. Detection of Staphylococcal Enterotoxin H by an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 59, 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.

TAMMELIN, A. et al. Nasal and hand carriage of *Staphylococcus aureus* in staff at a Department for Thoracic and Cardiovascular Surgery: endogenous or exogenous source? **Infection Control and Hospital Epidemiology**, Thorofare, v. 24, p. 686-689, 2003.

TANG, X. et al. A single-tube nested PCR for *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.35, p. 1597-1599, 1997.

TAVARES, W. Bactérias Gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 33, 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.

TENOVER, F. C. et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 33, p. 2233-2239, 1995.

TODD, J.; FISHAUT M. Toxic shock syndrome associated with phage-group-1 staphilococci. **Lancet**, London, v. 2, p. 1116-1118, 1978.

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

TOUROVA, T. P. Copy number of ribosomal operons in prokaryotes and its effect on



phylogenetic analysis. **Microbiology**, New York, v. 72, p. 389-402, 2003.

TRABULSI, L. R. et al. **Microbiologia**. 3. ed., São Paulo: Ed. Atheneu, 2002.

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.

UDO E. E. et al. Enterotoxin production by coagulase-negative staphylococci in restaurant workers from Kuwait City may be a potential cause of food poisoning. **Journal of Medical Microbiology**, London, v. 48, p. 819-823, 1999.

VANDENBERGH, M. F. Q.; VERBRUGH, H. A. Carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology and clinical relevance. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, Saint Louis, v. 133, p. 525-534, 1999.

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

VERNOZY-ROZAND, C. et al. Enterotoxin production by coagulase-negative staphylococci isolated from goats milk and cheese. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.30, p. 271-280, 1996.

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

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, p. 10102-10107, 2002.

WILKINSON, B.J. Staphylococcal capsules and slime. In: EASMON, C.S.F.; ADLAM, C. (Ed.). **Staphylococci and staphylococcal infections**. London: Academic Press, 1983, p. 481-524.

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, p. 5835-5845, 2002.

YAMASAKI, O. et al. Clinical manifestations of staphylococcal scalded-skin syndrome depend on serotypes of exfoliative toxins. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 43, p. 1890-1893, 2005.

ZADOKS, R. N. et al. Comparison of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine and human skin, milking equipment and bovine milk by phage typing, pulse-field gel electrophoresis and binary typing. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 11, p. 3894-3902, 2002.

ZAHA, A. et al. **Biologia Molecular Básica**. 3. ed. Porto Alegre: Mercado Aberto, 2003.

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

**APÊNDICE**

## APÊNDICE A - Artigo Científico

**Tipagem molecular e investigação dos genes toxigênicos em *Staphylococcus aureus* isolados de amostras clínicas.**

Mariana de Azevedo Andrade<sup>1</sup>, Maria do Carmo Monteiro Villar<sup>2</sup>, Nilma Cintra Leal<sup>1</sup>, Tereza Cristina Leal-Balbino<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Microbiologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães - CPqAM/Fiocruz, Recife-PE, Brasil

<sup>2</sup>Setor de Bacteriologia, da Unidade Laboratorial do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (HC), Recife-PE, Brasil

\*Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM/Fiocruz). Departamento de Microbiologia. Campus da UFPE, s/nº. Cidade Universitária. CEP: 50670-420. Recife, PE, Brasil. Fone: +55 081-2101 2633, Fax: +55 081-3453 2449. E-mail: cristina@cpqam.fiocruz.br

---

Artigo a ser enviado para *Acta Tropica*. ISSN:0001-706X. Fator de Impacto JCR (2006): 2.211. QUALIS<sup>CAPES</sup>: A (Internacional), 2008.

**Resumo**

*Staphylococcus aureus* é uma bactéria oportunista e representa a espécie geralmente envolvida em infecções humanas, tanto de origem comunitária quanto hospitalar. Neste estudo, a frequência dos genes das toxinas estafilocócicas (*sea-seh*, *tst*, *eta* e *etb*) foi investigada em oitenta isolados clínicos de *S. aureus*, oriundos de diversas fontes de infecção e setores de um hospital público da cidade do Recife/PE, Brasil, pela PCR (Reação em Cadeia da Polimerase). Foi analisada, também, a diversidade genética dos isolados de *S. aureus* no ambiente hospitalar, através da análise do polimorfismo da região 3' terminal do gene da coagulase (PCR *coa*) e da região intergênica 16S-23S dos operons ribossomais (ribotipagem-PCR). O gene toxigênico mais frequente foi *seg*, presente em todas as amostras portadoras 79/79 (100%), seguido por *seh* 10/79 (12,7%) e *sea* 09/79 (11,4%). A PCR-*coa* revelou quatro coagulotipos (Perfil 1-4), sendo o perfil 2 (~800pb) o mais prevalente presente em 39/80 (48,75%) isolados de *S. aureus*. A ribotipagem-PCR demonstrou 3 a 7 fragmentos de 390 a 680pb, distribuídos em onze ribotipos (R1-R11). R1 e R4 foram os ribotipos mais comuns, presentes em 28,75% dos isolados estudados. Os coagulotipos e ribotipos foram distribuídos entre os três setores do hospital (ambulatório, enfermaria e UTI). Estes dados revelaram um grande polimorfismo genético e demonstraram uma dispersão clonal dos *S. aureus* no ambiente hospitalar.

Palavras-chave: *Staphylococcus aureus*, exotoxinas, tipagem molecular, saúde pública.

## 1. Introdução

*Staphylococcus aureus* é responsável por uma grande diversidade de problemas médicos, incluindo infecções de pele e tecidos moles, infecções de sítios cirúrgicos, endocardites e bacteremias adquiridas em hospitais. Diversas infecções estafilocócicas já foram relatadas por conta do desenvolvimento de procedimentos médicos, incluindo o uso de próteses, imunossupressores e cateteres (Koneman et al., 2001; Casey et al., 2007).

Esta bactéria permanece como um dos patógenos mais comuns em infecções sistêmicas de origem comunitária e hospitalar. Diversos estudos epidemiológicos, incluindo a Vigilância Nacional de Infecções Nosocomiais dos Estados Unidos, mostraram que a incidência de infecções por *S. aureus* vem aumentando consideravelmente nas últimas décadas em todas as faixas etárias, incluindo recém-nascidos (Ladhani et al., 1999).

*S. aureus* assume relevância para a saúde pública, pois pode produzir enterotoxinas, sendo frequentemente envolvido em intoxicações alimentares, caracterizadas clinicamente por náuseas, vômito, mal-estar, debilidade geral, diarreia aquosa não sanguinolenta e dor abdominal (Freitas et al., 2004; Fisher et al., 2007). A detecção de enterotoxinas é epidemiologicamente fundamental (Sharma et al., 2000), pois a intoxicação alimentar estafilocócica ocorre com frequência no mundo inteiro (Bergdoll, 1989). Esta espécie também pode causar outras doenças como a Síndrome da Pele Escaldada (Ladhani et al., 1999) e a Síndrome do Choque Tóxico (Dinges et al., 2000).

As enterotoxinas foram classificadas em cinco tipos sorológicos SEA, SEB, SEC, SED e SEE. Contudo novas enterotoxinas já foram descritas na literatura, incluindo SEG, SEH, SEI, SEJ, SEK, SEL, SEM, SEN, SEO, SEP, SEQ, SER e SEU (Ren et al., 1994; Su e Wong, 1995; Munson et al., 1998; Zhang et al., 1998; Jarraud et al., 2001; Orwin et al., 2001; Letertre et al., 2003; Omoe et al., 2003).

A Síndrome da Pele Escaldada é causada por determinadas cepas de estafilococos produtoras de toxinas chamadas de esfoliativas A (ETA) e B (ETB) (Koneman et al., 2001). Estas toxinas apresentam atividade proteolítica e dissolvem a matriz mucopolissacarídica da epiderme, resultando na separação intra-epitelial das ligações celulares do estrato granuloso, observando-se a formação de bolhas em amplas áreas corpóreas. A doença é usualmente observada em recém-nascidos e lactentes (Koneman et al., 2001; Trabulsi et al., 2002), embora adultos com infecções latentes também sejam susceptíveis (Ladhani et al., 2001).

A Síndrome do Choque Tóxico Estafilocócico (TSS) é uma doença caracterizada por ocasionar febre, hipotensão, vertigem ortostática, eritrodermia (rash), vômitos de intensidade variada, diarreia, insuficiência renal, cefaléia, calafrios, faringite, conjuntivite (Koneman et al., 2001; Trabulsi et al., 2002) e descamação da pele, principalmente nas palmas das mãos e nas solas dos pés (Trabulsi et al., 2002). A toxina-1 da síndrome do choque tóxico (TSST-1) é reconhecida como a principal causa da TSS (Johnson et al., 1991; Rajagopalan et al., 2007).

*S. aureus* produz uma substância chamada coagulase, um fator enzimático que causa coagulação da fibrina no plasma, resultando numa espécie de coágulo (Koneman et al., 2001). A produção da coagulase é um importante determinante fenotípico na caracterização de isolados de *S. aureus* e geralmente está associada a patogenicidade e enterotoxigenicidade, apesar do seu papel como fator de virulência ainda não estar claro. No entanto alguns autores isolaram estafilococos coagulase negativos enterotoxigênicos das mãos de manipuladores de alimentos, leite e derivados (Su et al., 1999; Udo et al., 1999; Silva et al., 2005).

O conhecimento do perfil epidemiológico-molecular das doenças causadas por *S. aureus* poderá auxiliar na elaboração de estratégias de controle mais eficientes para a redução da infecção, uma vez que, a partir dos perfis moleculares, pode-se inferir relações genéticas entre os diferentes clones, detectar o fluxo gênico e traçar rotas de dispersão da infecção (Lange et al., 1999; Sommeräuser et al., 2003).

Em vista da considerável heterogeneidade genética em populações naturais de *S. aureus*, sistemas apropriados de tipagem são necessários para determinar a estrutura genética dos isolados, proporcionando uma estratégia efetiva de controle epidemiológico (Pereira et al., 2002).

Dessa forma, este trabalho objetivou realizar um estudo epidemiológico-molecular em *S. aureus*, isolados de amostras clínicas, em um hospital público do Recife/PE, Brasil, para compreender melhor os mecanismos de patogenicidade destes microrganismos no homem e verificar sua dispersão no ambiente hospitalar estudado.

## **2. Material e Métodos**

### **2.1 Amostras de *Staphylococcus aureus* estudadas**

Foram estudados 80 isolados clínicos de *S. aureus*, gentilmente cedidos pelo Setor de Bacteriologia, da Unidade Laboratorial do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (HC), Recife-PE, Brasil, obtidos de diversas origens de infecção e oriundos de diferentes setores do hospital (ambulatório, enfermaria e unidade de tratamento intensivo). Este projeto foi aprovado pelo comitê de ética do CPqAM (CAAE: 0024.0.095.000-07).

### **2.2 Extração do DNA genômico**

Para a realização do trabalho os isolados foram plaqueados em Agar Sangue e incubados a 37°C por 24 horas, com o objetivo de confirmar a pureza das culturas. Em seguida colônias isoladas foram repicadas em BHI (Brain Heart Infusion, Biobrás) para extração do DNA.

Após 24 horas de incubação a 37°C em 5mL de caldo BHI, 1mL da cultura bacteriana foi transferido para um microtubo e centrifugado (2.500 x g), a 4°C durante 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e, ao sedimento, adicionou-se 500µL de TE 10:1 (Tris-HCl 10mM, pH 8,0; EDTA 1mM).

Após nova centrifugação (2.500 x g) por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e, ao sedimento, foi adicionado mais 500µL de TE 10:1, 10µL de solução de lisozima (10 mg/mL) e 10µL de solução de proteinase K (5 mg/mL). Os microtubos foram incubados a 60°C por 20 minutos para iniciar a lise bacteriana. Logo em seguida foi adicionado 100µL de STE (SDS 2,5%; Tris-HCl 10mM, pH 8,0; EDTA 0,25M), incubando-se por mais 15 minutos a 60°C.

Após 5 minutos à temperatura ambiente e 5 minutos no gelo, a suspensão foi neutralizada com 130µL de acetato de amônio 7,5M, permanecendo no gelo por 15 minutos. A suspensão foi então centrifugada (2.500 x g) por 10 minutos e o sobrenadante, aproximadamente 700µL foi transferido para um novo microtubo, onde foi adicionado o mesmo volume de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1), homogeneizando e centrifugando (2.500 x g) por 5 minutos a fim de precipitar proteínas e restos celulares. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo e o DNA precipitado com 420µL de isopropanol a -20°C por 24 horas.

Os tubos foram centrifugados por 10 minutos (2.500 x g) e, após eliminação do sobrenadante, o sedimento, contendo o DNA foi seco em centrífuga a vácuo por 5 minutos. Em seguida, o DNA genômico foi finalmente ressuspenso em 10µL de água deionizada estéril e quantificado por meio de eletroforese em gel de agarose 1% (m/v) em tampão TBE 0,5X (Tris-borato 0,089M; ácido bórico 0,089M; EDTA, 0,002M) a 120V. Após a migração, o DNA foi corado em solução aquosa de brometo de etídio (15 mg/mL), observado e fotografado em transiluminador de luz ultravioleta (UV). A quantificação do DNA foi



realizada por comparação com o padrão de DNA do fago  $\lambda$  clivado com enzima de restrição *HindIII* (marcador) usando o programa 1D Image Analysis Software, version 3.5 da Kodak Digital Science, DC 120 zoom Digital Câmera.

### 2. 3 Investigação dos genes responsáveis pelas exotoxinas em *S. aureus*

Foram investigados os genes responsáveis pelas enterotoxinas estafilocócicas (SEA, SEB, SEC, SED, SEE, SEG e SEH), além das toxinas estafilocócicas esfoliativas (ETA e ETB) e a toxina 1 da síndrome do choque tóxico (TSST-1).

Duas reações de PCR-multiplex foram preparadas; uma designada para detectar os genes das enterotoxinas estafilocócicas (*sea-see*) e outra para detectar os genes *tst*, *eta* e *etb*. As amplificações foram realizadas num termociclador programado para 30 ciclos, compreendendo 95°C para desnaturação da fita de DNA por 1 minuto, 60°C para anelamento dos *primers* por 1 minuto e 72°C para síntese da fita por 2 minutos. Os *primers* foram desenhados como descrito por Becker et al., (1998) (Tabela 1).

As reações para PCR-multiplex foram preparadas para um volume final de 25 $\mu$ L contendo 20 $\mu$ mol de cada *primer*, 10mM Tris-HCl, pH 9,0, 50mM de KCl, 160 $\mu$ M de cada dNTP, 3mM de MgCl<sub>2</sub>, 20ng de DNA genômico e 1,2U da *Taq* DNA polimerase (Invitrogen, Brasil). Como controle da especificidade das reações de PCR, foram utilizadas as cepas padrão de *S. aureus* FRI (Food Research Institute Madison, Wiscosin, EUA); FRI MN8 portadora do gene *tst*, FRI 722 portadora do gene *sea*, FRI S6 gene *seb*, FRI 361 genes *sec*, *sed* e *sei* e FRI 1151 gene *sed*, cedidas gentilmente pelo Laboratório de Enterotoxinas Estafilocócicas da Fundação Ezequiel Dias (FUNED-MG), Recife-PE.

A pesquisa dos genes *seg* e *seh* foi realizada pela PCR-uniplex usando *primers* desenhados como descrito por Rosec; Gigaude (2002) (Tabela 1). As amplificações foram

aquecidas a 94°C por 3 minutos, seguido de 50 ciclos de 94°C por 30secs, 60°C por 30secs e 72°C por 30secs. As reações consistiram de uma mistura de 20pmol de cada *primer*, 160µM de cada dNTP, 1,5mM do MgCl<sub>2</sub>, 10mM do Tris-HCl pH 9, 50mM de KCl, 20ng do DNA genômico e 1U da *Taq* DNA polimerase (Invitrogen, Brasil) para um volume final de 25µL. Foi usada para controle a cepa padrão de *S. aureus* FRI 361 portadora do gene *seg* e a cepa CR6 portadora do gene *seh*.

Os produtos de amplificação (*amplicons*) foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5% (m/v), corados com brometo de etídio (1,5 mg/mL), visualizados e fotografados em transiluminador de UV. Para confirmar a identidade dos fragmentos amplificados pela PCR, alguns *amplicons* foram purificados e seqüenciados. As seqüências obtidas foram analisadas pelo programa blast versão 2.2.12 (Altschul et al., 1990) e comparadas com seqüências depositadas no GenBank.

#### **2.4 Tipagem do gene da coagulase (*coa*) em *S. aureus***

A região 3'- terminal do gene *coa* foi amplificada utilizando o seguintes *primers* específicos *COAG2* (5' 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 para um volume final de 25µL, contendo: 20ng do DNA genômico, tampão PCR 10x (10 mM Tris-HCl, pH 9,0; 50mM de KCl), 1,5mM de MgCl<sub>2</sub>, 1µM de cada *primer*, 160µM de desoxinucleotídeos trifosfato (dNTP's) e 1U de *Taq* DNA Polimerase, 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 segundos a 95°C, 2 minutos a 62°C e 4 minutos a 72°C. Os *amplicons* foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5% (m/v), corados com brometo de etídio (15 mg/mL), visualizados e fotografados em transiluminador de UV. Foi utilizado um marcador de peso molecular de 100pb (DNA *ladder*) para calcular o tamanho dos *amplicons*.

## 2.5 Ribotipagem-PCR

Para amplificação da região 16S-23S, foi utilizado um par de oligonucleotídeos descritos por Jensen et al. (1993) [RIB1] (5'-GAA GTC GTA ACA AGG-3') e [RIB2] (5'-CAA GGC CAC CGT-3'). A reação foi preparada para um volume final de 25µL contendo 20pmol de cada oligonucleotídeo, 20ng de DNA, 10mM Tris-HCl pH 9.0, 50mM KCl, 1,5mM MgCl<sub>2</sub>, 1U de *Taq* DNA polimerase e 200µM de dNTPs. Os 30 ciclos de amplificação consistiram de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 55°C e 1 minuto a 72°C, seguido de uma extensão final de 4 minutos a 72°C.

Os *amplicons* foram analisados por eletroforese em géis de agarose a 2,0%, corados com brometo de etídio, visualizados e fotografados em transiluminador de luz UV. Um marcador de peso molecular (DNA *ladder* de 100 pb) foi utilizado como padrão para estimar o tamanho dos fragmentos amplificados.

## 3. Resultados

### 3.1 Pesquisa das exotoxinas nos *S. aureus* isolados

Nas reações de PCR, nenhuma dos isolados analisados possuía os genes *sed*, *see* e *etb*. Houve apenas a amplificação do segmento de tamanho esperado para o gene *sed* na cepa de referência (FRI) usada como controle positivo. Entretanto, 79/80 (98,75%) dos isolados de *S. aureus* positivos para os genes toxigênicos amplificaram os genes *sea*, *seb*, *sec*, *seg*, *seh*, *eta* e *tst* separadamente ou em associações. O gene prevalente foi *seg*, presente em todas as amostras positivas 79/79 (100%), seguido por *seh* 10/79 (12,7%) e *sea* 09/79 (11,4%) (Figura1). Apenas um isolado oriundo de hemocultura na Unidade de Tratamento Intensivo (UTI) não comportou nenhum dos genes toxigênicos.

O gene *seg* foi observado em isolados provenientes do ambulatório, da enfermaria e da UTI, sendo mais freqüente na enfermaria e o único gene encontrado nos isolados presentes na UTI. Os genes *sea*, *seb*, *sec*, *seh* e *tst* foram identificados no ambulatório e na enfermaria, sendo mais freqüentemente encontrados no ambulatório. O gene *eta* foi observado em apenas um isolado oriundo do ambulatório de amostra de urina (Tabela 2).

Os 79 isolados de *S. aureus* positivos para os genes toxigênicos pela PCR foram distribuídos em 10 genótipos (*seg*, *seg* + *sec*, *seg* + *sea*, *seg* + *seb*, *seg* + *tst*, *seg* + *eta*, *seg* + *seh*, *seg* + *sec* + *tst*, *seg* + *sea* + *seh*, *seg* + *sea* + *seb* + *seh*). Os genótipos mais freqüentes foram; *seg* isoladamente em 56/79 (70,9%) dos isolados e em associações *seg*+ *seh* em 06/79 (7,6%) e *seg* + *sea* em 05/79 (6,3%). Entre os isolados positivos, 56/79 (70,9%) amplificaram apenas um gene, 17/79 (21,5%) amplificaram dois genes, 05/79 (6,3%) amplificaram três genes e 01/79 (1,3%) amplificou quatro genes.

Três sítios de infecção mais freqüentes foram avaliados: urina (18 isolados), os genes toxigênicos observados nos isolados deste sítio foram *sea*, *seb*, *seg*, *seh* e *eta*; secreção e ponta de cateter (13 isolados), genes *sea*, *sec*, *seg*, *seh* e *tst*; cultura de tecido e secreção de ferida operatória (10 isolados), genes *sea*, *seg*, *seh* e *tst*. Os genes *sea*, *seg*, *seh* foram observados em todos os isolados dos principais sítios de infecção (Figura 2).

### **3.2 Tipagem molecular dos *S. aureus* isolados de amostras clínicas, pelo polimorfismo do gene da coagulase (*coa*)**

Todos os isolados amplificaram o gene *coa* na reação de PCR. A amplificação do gene *coa* dos *S. aureus* isolados de amostras clínicas produziu quatro perfis genotípicos. Desta forma, os isolados foram distribuídos em quatro coagulotipos, de acordo com o tamanho do segmento amplificado (Perfil 1= ~700pb, Perfil 2= ~800pb, Perfil 3= ~900pb e Perfil 4= ~1000pb). A cepa utilizada como controle positivo (*S. aureus* ATCC 25923) amplificou um fragmento de ~800pb (Figura 3).

A maioria dos isolados 39/80 (48,75%) amplificou um fragmento de ~800pb (P2). Este perfil foi distribuído no ambulatório e na enfermaria, com maior frequência na enfermaria. O perfil 1 foi o segundo mais freqüente neste estudo, 35/80 (43,75%) dos isolados e observado nos três setores do hospital (ambulatório, enfermaria e UTI), sendo o único presente na UTI. Apenas cinco isolados amplificaram um fragmento de ~1000pb (P4), presentes na enfermaria e no ambulatório quase de forma equivalente. O perfil 3 foi observado em apenas um isolado presente na enfermaria.

Os sítios de infecção mais freqüentes onde foram isolados os *S. aureus* foram avaliados em relação aos coagulotipos observados: urina (18 isolados), distribuídos em três coagulotipos: P1, P2, P4, com predominância de P2; cultura de tecido e secreção de ferida operatória (10 isolados), distribuídos em três coagulotipos: P1, P2, P4, com predominância de P1 e P2; secreção e ponta de cateter (13 isolados), distribuídos em dois coagulotipos P1 e P2, com predominância de P1. Os perfis 1 e 2 foram observados em todos os principais sítios de infecção. O perfil 3 não foi observado nestes sítios de infecção por estar presente em apenas um isolado proveniente de secreção de dreno torácico (Figura 4).

### 3.3 Tipagem molecular dos isolados clínicos de *S. aureus* pela ribotipagem-PCR

Nas reações de ribotipagem-PCR, foram observados de 3 a 7 fragmentos de tamanho aproximado de 390 a 680 pb. Com base nos padrões de amplificação, os 80 isolados foram classificados em 11 ribotipos, denominados neste trabalho de R1 a R11 (Figura 5).

Neste estudo, os ribotipos mais comuns observados entre os isolados analisados foram R1 e R4 presentes em 28,75% dos isolados. O R1 incluiu os isolados distribuídos tanto no ambulatório quanto na enfermaria, sendo mais freqüente na enfermaria. O ribotipo R4 foi observado no ambulatório, na enfermaria e na UTI, no entanto, com maior freqüência na enfermaria. Este ribotipo foi o único encontrado na UTI.

O R3 foi observado em 13,75% dos isolados, distribuídos no ambulatório e na enfermaria, exibindo maior freqüência na enfermaria. O R2 (11,25% das amostras) também foi encontrado em isolados presentes no ambulatório e na enfermaria, contudo apresentou maior freqüência no ambulatório, e o R7 (6,25% das amostras) também foi encontrado em isolados presentes na enfermaria e no ambulatório. Os ribotipos R5, R6, R8, R9, R10 e R11 foram encontrados apenas em um ou dois isolados e foram exclusivos de determinado setor do hospital (ambulatório ou enfermaria), com exceção do R9 encontrado no ambulatório e na enfermaria.

Os sítios de infecção onde foram isolados os *S. aureus* mais freqüentes neste estudo foram: urina (18 isolados), distribuídos em seis ribotipos: R1, R2, R3, R4, R7, R9, com predominância de R1; cultura de tecido e secreção de ferida operatória (10 isolados), distribuídos em cinco ribotipos: R1, R2, R4, R7, R9, com predominância de R1; secreção e ponta de cateter (13 isolados), distribuídos em cinco ribotipos R1, R3, R4, R7, R10, com predominância de R4. O R1, R4 e R7 foram observados em todos os principais sítios de

infecção. Os ribotipos R5, R6, R8 e R11 não foram observados nestes sítios de infecção por estarem distribuídos num menor número de isolados (Figura 6).

Os coagulotipos foram subtipados nos ribotipos; o coagulotipo 1 (P1) foi distribuído entre os ribotipos R2, R3, R4, R6, R7; o coagulotipo 2 (P2) foi distribuído entre os ribotipos R1, R2, R3, R5, R6, R8, R9, R10, R11; o coagulotipo 4 (P4) foi distribuído entre os ribotipos R2, R3, R9. O coagulotipo 3 (P3) mostrou relação apenas com o ribotipo R4, pois só um isolado exibiu este coagulotipo. Os ribotipos R1, R7 e R11 apresentaram relação direta com os coagulotipos P2, P1 e P2, respectivamente (Tabela 3).

Todos os cinco isolados oriundos da UTI apresentaram o mesmo coagulotipo (P1) e o mesmo ribotipo (R4), além de apresentarem apenas a presença do gene *seg*.

### **3.5 Correlação entre os genes toxigênicos e a produção da coagulase em *S. aureus***

Neste estudo não houve correlação entre a produção da coagulase e a presença de genes enterotoxigênicos nos *S. aureus* estudados, uma vez que os diferentes coagulotipos apresentaram os mesmos genes toxigênicos.

O perfil 1 apresentou relação com os genótipos: *seg*, *seg+sea*, *seg+seb*, *seg+seh*, *seg+eta*, *seg+sea+seh*, *seg+sea+seb+seh*. O genótipo mais freqüente foi *seg* presente em 26/35 (74,3%) dos isolados que exibiram este perfil e apenas um isolado não apresentou os genes toxigênicos. O perfil 2 apresentou relação com os genótipos: *seg*, *seg+sea*, *seg+seb*, *seg+sec*, *seg+seh*, *seg+tst*, *seg+sec+tst*. O genótipo mais freqüente também foi *seg* presente em 26/39 (66,7%) isolados. Um único isolado exibiu o perfil 3, que apresentou relação com o gene *seg*. O perfil 4 apresentou relação com os genótipos: *seg*, *seg+seb*, *seg+seh*, sendo o genótipo *seg* mais freqüente, presente em 03/05 (60%) isolados.

#### 4. Discussão

Neste estudo, a frequência de isolados comportando os genes que codificam as toxinas mais recentemente descritas (SEG e SEH) foi significativa. O gene *seg* foi observado em todas as amostras positivas para os genes toxigênicos e o gene *seh* foi o segundo mais freqüente, presente em 12,7% dos isolados positivos. Com exceção de *eta*, presente em apenas um isolado oriundo do ambulatório, todos os genes amplificados foram observados em isolados presentes tanto no ambulatório, quanto na enfermaria. O gene *seg* foi o único observado em isolados presentes em todos os setores do hospital estudado (ambulatório, enfermaria e UTI), demonstrando a presença apenas deste gene neste último setor.

Todos os três genes clássicos (*sea*, *seb* e *sec*) foram observados associados ao gene *seg* mais recentemente descrito. Os genes *sea*, *seg*, *seh* foram observados em isolados presentes em todos os principais sítios de infecção (urina, secreção e ponta de cateter, cultura de tecido e secreção de ferida operatória). O gene *tst* foi encontrado em associação a *seg* e *sec* e o gene *eta* associado a *seg*.

É importante ressaltar que *tst* foi observado em três isolados provenientes de secreção vaginal (paciente ambulatorial), ponta de cateter (paciente de enfermaria) e secreção de ferida operatória (paciente ambulatorial). *S. aureus* é o responsável pelos casos menstruais da Síndrome do Choque Tóxico e por cerca de metade dos casos não menstruais. De acordo com Koneman et al. (2001), esta síndrome foi descrita como uma complicação de abscessos estafilocócicos, osteomielite, infecções de feridas cirúrgicas e pneumonia pós-influenza.

O gene *eta* foi verificado em apenas um isolado, proveniente de urina, de um paciente ambulatorial. Os baixos índices de isolados portadores dos genes *eta* e *etb* estão em conformidade com outras investigações, embora sejam bastante escassos os dados



epidemiológicos sobre *S. aureus* portadores destes genes (Becker et al., 2003; Yamasaki et al., 2005).

Em diferentes regiões do mundo são observados distintos percentuais para os genes toxigênicos (Silva et al., 2005). O papel destas SEs recentemente descritas na intoxicação alimentar estafilocócica, ainda permanece 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 toxinas SEA, SEB, SEC, SED ou SEE, mas detectaram a presença dos genes toxigênicos *seg*, *seh*, *sei* e *sej*, indicando que estas novas SEs podem ser responsáveis por tais surtos de intoxicação alimentar.

Diversos estudos corroboram com os nossos resultados, em relação à expressiva presença dos genes das toxinas mais recentemente estudadas em *S. aureus* e também retificam a observação de que apenas os genes responsáveis pelas toxinas clássicas estão envolvidos em intoxicações alimentares e outras doenças (Becker et al., 2003; Omoe et al., 2002; Bania et al., 2006).

*S. aureus* representa um risco para a saúde pública, uma vez que esta bactéria é freqüentemente envolvida em doenças de origem comunitária e hospitalar. A aplicação de técnicas moleculares na detecção das exotoxinas estafilocócicas é um passo relevante para se caracterizar rapidamente estas toxinas, além de gerar informações que possam contribuir para o conhecimento e controle das doenças.

De um modo geral, foram analisados quatro coagulotipos, sendo a maioria dos isolados observados na enfermaria e no ambulatório, no qual um destes encontrava-se também na UTI, indicando uma dispersão clonal dos isolados dentro do ambiente hospitalar, podendo ser responsáveis por infecções nosocomiais no hospital estudado. Nos sítios de infecção mais freqüentes, houve predominância dos perfis 1 e 2, por serem os coagulotipos mais comumente encontrados.

Diversos estudos epidemiológicos de *S. aureus* utilizam a análise do polimorfismo do gene da coagulase com sucesso (Montesinos et al., 2002). Porém, alguns trabalhos encontraram limitação no uso desta técnica, obtendo resultados pouco discriminatórios, sugerindo sua associação a outros métodos de tipagem (Schwarzkopf; Karch, 1994; Shopsin et al., 2000). Neste estudo, a tipagem dos isolados através do gene da coagulase produziu quatro coagulotipos entre os isolados distribuídos nos setores do hospital estudado.

Nas reações de ribotipagem-PCR, dos onze ribotipos encontrados, seis foram observados em isolados da enfermaria e do ambulatório. Na enfermaria foram observados nove ribotipos diferentes, demonstrando a presença de nove diferentes isolados circulando neste setor do hospital. No ambulatório foi observada a presença de oito ribotipos, demonstrando a presença de oito diferentes isolados presentes neste setor. Na UTI apenas um ribotipo foi encontrado, no entanto, este ribotipo foi observado também em isolados procedentes do ambulatório e da enfermaria, indicando a circulação deste clone nos três setores do hospital. Estes resultados demonstraram uma dispersão clonal dos isolados dentro do ambiente hospitalar estudado.

Alguns trabalhos que utilizam a ribotipagem-PCR corroboram com o amplo polimorfismo encontrado em nossos estudos, considerando a quantidade de isolados e o número de ribotipos observados, indicando uma dispersão dos isolados nos setores do hospital, como também, mostrando que *S. aureus* permanece como um dos patógenos mais comuns em infecções sistêmicas de origem comunitária e hospitalar (Jensen et al., 1993; Pereira et al, 2002; Silveira-Filho, 2007).

Apenas um clone de *S. aureus* foi encontrado na UTI e distribuído também no ambulatório e na enfermaria, demonstrando a circulação deste isolado em todo o ambiente hospitalar analisado.

A técnica de ribotipagem-PCR tem a vantagem de ser menos propensa a variações, porque é específica e realizada sob condições de alta estringência. Dessa forma, o polimorfismo da região 16S-23S dos operons ribossomais foi mais discriminatório que a análise do gene *coa*. No entanto, a associação entre as duas técnicas de tipagem mostrou-se necessária para uma caracterização mais aprofundada da heterogeneidade genética de *S. aureus*, isolados de amostras clínicas, no hospital estudado.

Em conclusão, neste estudo foi observada a expressiva presença de genes enterotoxigênicos entre os *S. aureus* estudados, representando potencial risco para a saúde pública. Os isolados de *S. aureus* apresentaram grande polimorfismo genético considerando o número de amostras estudadas, o número de ribotipos e coagulotipos identificados. A ribotipagem - PCR e a PCR do gene da coagulase, mostraram-se ferramentas úteis na tipagem de *S. aureus* de diferentes origens, pois foi possível verificar uma ampla dispersão dos isolados estudados entre os diferentes setores do hospital.

### **Agradecimentos**

Ao Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM) pelo desenvolvimento do projeto, ao Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (HC) por ceder gentilmente os isolados clínicos, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

## Referências

- Aarestrup, FM, Dangler, CA, Sordillo, LM; 1995. Prevalence of coagulase gene polymorphism in *Staphylococcus aureus* isolates causing bovine mastitis. *Can. J. Vet. Res.* 2, 124, 128.
- Altschul, SF, Gish, W, Miller, W, Myres, EW, Lipman, DJ; 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403-410.
- Bania, J, Dabrowska, A, Korzekwa, K, Zarczynska, A, Bystron, J, Chrzanowska, J, Molenda, J; 2006. The profiles of enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* from nasal carriers. *Lett. Appl. Microbiol.* 42, 315, 320.
- Becker, K, Friedrich, AW, Lubritz, G, Weilert, M, Peters, G, Eiff, C; 2003. Prevalence of Genes Encoding Pyrogenic Toxin Superantigens and Exfoliative Toxins among Strains of *Staphylococcus aureus* Isolated from Blood and Nasal Specimens. *J. Clin. Microbiol.* 41, 1434, 1439.
- Becker, K, Roth, R, Peters, G; 1998. Rapid and specific detection of toxigenic *Staphylococcus aureus*: Use of two multiplex PCR enzyme immunoassay for amplification and hybridization of staphylococcal enterotoxin genes, exfoliative toxin genes, and toxic shock syndrome toxin 1 gene. *J. Clin. Microbiol.* 36, 2548, 2553.
- Bergdoll, MS; 1989. *Staphylococcus aureus*. In *Foodborne Bacterial Pathogens*. Marcell Dekker, New York. 463, 523.
- Casey, AL, Lambert, PA, Elliott, TSJ; 2007. Staphylococci. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 29, 23, 32.
- Dinges, MM, Orwin, PM, Schlievert, PM; 2000. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin. Microbiol. Rev.* 13, 16, 34.
- Fischer, A, Eiff, C, Kuczius, T, Omoe, K, Peters, G, Becker, K; 2007. A quantitative real-time immuno-PCR approach for detection of staphylococcal enterotoxins. *J. Mol. Med.* 85, 461, 469.
- Freitas, MFL, Leal-Balbino, TC, Mota, RA, Stamford, TLM; 2004. Exotoxinas Estafilocócicas. *Cienc. Vet. Trop.* 7, 63, 74,
- Jarraud, S, Peyrat, MA, Lim, A, Tristan, A, Bes, M, Mougei, C, Etienne, J, Vandenesch, F, Bonneville, M, Lina, G. L; 2001. *egc* a highly prevalent operon of enterotoxin gene, forms a putative nurse of superantigens in *Staphylococcus aureus*. *J. Immunol.* 166, 669, 677.
- Jensen, MA, Webster, JA, Straus, N; 1993. Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction-amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 945, 952.

- Johnson, WMS, Tyler, SD, Ewan, EP, Ashton, FE, Pollard, DR, Rozee, KR; 1991. Detection of genes for enterotoxins, exfoliative toxins, and toxic shock syndrome toxin 1 in *Staphylococcus aureus* by the polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol. 29, 426, 430.
- Koneman, EW, Allen, SD, Janda, WM, Schreckenberger, PC, Winn Jr., WC ; 2001. Cocos Gram-Positivos: Parte I: Estafilococos e Microrganismos Relacionados, p.551-588. In Koneman, EW, Allen, SD, Janda, WM, Schreckenberger, PC, Winn Jr., WC. Diagnóstico Microbiológico – Texto e Atlas Colorido. 5ª Edição. Medsi, Rio de Janeiro. 522, 579.
- Ladhani, S, Joannou, CL, Lochrie, DP, Evans, RW, Poston, SM; 1999. Clinical, microbial, and biochemical aspects of the exfoliative toxins causing staphylococcal scalded-skin syndrome. Clin. Microbiol Rev. 12, 224, 242.
- Ladhani, S, Robbie, S, Garratt, RC, Chapple, DS, Joannou, CL, Evans, RW; 2001. Development and evaluation of detection system for staphylococcal exfoliative toxin A responsible for scalded-skin syndrome. J. Clin. Microbiol. 39, 2050, 2054.
- Lange, C, Cardoso, M, Senczek, D, Schwarz, S; 1999. Molecular subtyping of *Staphylococcus aureus* isolates from cases of bovine mastitis in Brazil. Vet. Microbiol. 67, 127, 141.
- Letertre, C, Perelle, S, Dilasser, F, Fach, P; 2003. Identification of a new putative enterotoxin SEU encoded by *egc* cluster of *Staphylococcus aureus*. J. Appl. Microbiol. 2, 63, 76.
- McLauchlin, J, Narayanan, GL, Mithani, V, O'Neil, G; 2000 The detection of enterotoxins and toxic shock syndrome toxin genes in *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction. J. Food Prot. 63, 479, 488.
- Montesinos, I, Salido, E, Delgado, T, Cuervo, M, Sierra, A; 2002. Epidemiologic genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis at a university hospital and comparison with antibiotyping and protein A and coagulase gene polymorphism. J. Clin. Microbiol. 40, 2119, 2125.
- Munson, SH, Tremaine, MT, Betley, MJ, Rodney, AW; 1998. Identification and characterization of *Staphylococcus* enterotoxin type G and I from *Staphylococcus aureus*. Infect. Immun. 66, 3337, 3348.
- Omoe, K, Hu, DL, Omoe, TH, Nakane, A, Shinagawa, K; 2003. Identification and characterization of a new staphylococcal enterotoxin-related putative toxin encoded by two kinds of plasmids. Infect. Immun. 71, 6088, 6094.
- Omoe, K, Ishikawa, M, Shimoda, Y, Hu, D. L, Ueda, S, Shinagawa, K; 2002. Detection of *seg*, *seh* and *sei* genes in *Staphylococcus aureus* isolates and determination of the enterotoxin productivities of *S. aureus* isolates harboring *seg*, *seh* ou *sei* genes. J. Clin. Microbiol. 40, 857, 862.

- Orwin, PM, Leung, DYM, Heather, LD, Schlievert, PM; 2001. Biochemical and Biological Properties of Staphylococcal Enterotoxin K. *Infect. Immun.* 69, 360, 366.
- Pereira, MSV, Leal, NC, Leal, TCA, Sobreira, M, Almeida, AMP, Siqueira-Jr, JP, Campos-Takaki, GM; 2002. Typing of human and bovine *Staphylococcus aureus* by RAPD and ribotyping-PCR. *Lett. Appl. Microbiol.* 35, 32,36.
- Rajagopalan, G, Smart, MK, Murali, N, Patel, R, David, CS; 2007. Acute systemic immune activation following vaginal exposure to staphylococcal enterotoxin B— Implications for menstrual shock. *J. Reprod. Immunol.* 73, 51, 59.
- Ren, K, Bannan, JD, Pancholi, V, Cheung, AL, Robbins, JC, Fischetti, VA, Zabriskie, JB; 1994. Characterization and biological properties of a new staphylococcal enterotoxin. *J. Exp. Med.* 180, 1675, 1683.
- Rosec, JP, Gigaud, O; 2002. Staphylococcal enterotoxin genes of classical and new types detected by PCR in France. *Int. J. Food Microbiol.* 25, 61, 67.
- Schwarzkopf, A, Karch, H; 1994. Genetic variation in *Staphylococcus aureus* coagulase genes and limits for use as epidemiological marker. *J. Clin. Microbiol.* 32, 2407, 2412.
- Sharma, NK, Ress, CED, Dodd, CER; 2000. Development of a single-reaction multiplex PCR toxin typing assay for *Staphylococcus aureus* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 1347, 1353.
- Shopsin, B, Gomez, M, Waddington, M, Riehman, M, Kreiswirth, BN; 2000. Use of coagulase gene (*coa*) repeat region nucleotide sequences for typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *J. Clin. Microbiol.* 38, 3453, 3456.
- Silva, ER, Boechat, JUD, Martins, JCD, Ferreira, WPB, Siqueira, AP, Silva, N; 2005. Hemolysin production by *Staphylococcus aureus* species isolated from mastitic goat milk in Brazilian dairy herds. *Small Ruminant Res.* 56, 271–275.
- Silveira-Filho, VM; 2007. Tipagem molecular de *Staphylococcus aureus* isolados de casos de mastite bovina no Estado de Pernambuco. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco, Brasil. Departamento de Genética, 82p.
- Sommeräuser, J, Kloppert, B, Wolter, W, Zschöck, M, Sobiraj, A, Failing, K; 2003. The epidemiology of *Staphylococcus aureus* infections from subclinical mastitis in dairy cows during a control programme. *Vet. Microbiol.* 96, 91, 102,
- Su, C, Herbelin, C, Frieze, N, Skardova, O, Sordillo, LM; 1999. Coagulase gene polymorphism of *Staphylococcus aureus* isolates from dairy cattle in different geographical areas. *Epidemiol. Infect.* 122, 329, 336.
- Su, YC, Wong, ACL; 1995. Identification and purification of a new staphylococcal enterotoxin, H. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 1438, 1443.
- Trabulsi, LR, Alterthum, F, Gompertz, OF, Candeias, JAN; 2002. *Microbiologia.* 3º

Edição, Atheneu, São Paulo. 143, 156.

Udo, EE, Al-Bustan, MA, Jacob, LE, Chugh, TD; 1999. Enterotoxin production by coagulase-negative staphylococci in restaurant workers from Kuwait City may be a potential cause of food poisoning. *J. Med. Microbiol.* 48, 819, 823.

Yamasaki, O, Yamaguchi, T, Sugai, M, Chapuis-Cellier, C, Arnaud, F, Vandenesch, F, Etienne, J, Lina, G; 2005. Clinical manifestations of staphylococcal scalded-skin syndrome depend on serotypes of exfoliative toxins. *J. Clin. Microbiol.* 43, 1890,1893.

Zhang, S, Iandolo, JJ, Stewart, GC; 1998. The enterotoxin D plasmid of *Staphylococcus aureus* encodes a second enterotoxin determinant (sej). *FEMS Microbiol. Lett.* 168, 227, 233.

Tabela 1. Sequências de *primers* usados na análise da PCR para a detecção dos genes *sea-see*, *seg*, *seh*, *tst*, *eta* e *etb* em isolados de *S. aureus*, oriundos de amostras clínicas, de um hospital público de Recife-PE.

Gene	Primer	Sequência de Oligonucleotídeos (5'→3')	Tamanho do Fragmento (pb)
* <i>sea</i>	SEA-3b	CCT TTG GAA ACG GTT AAA ACG	127
	SEA-4b	TCT GAA CCT TCC CAT CAA AAA C	
* <i>seb</i>	SEB-1c	TCG CAT CAA ACT GAC AAA CG	477
	SEB-4b	GCA GGT ACT CTA TAA GTG CCT GC	
* <i>sec</i>	SEC-3b	CTC AAG AAC TAG ACA TAA AAG CTA GG	271
	SEC-4b	TCA AAA TCG GAT TAA CAT TAT CC	
* <i>sed</i>	SED-3b	CTA GTT TGG TAA TAT CTC CTT TAA ACG	319
	SED-4b	TTA ATG CTA TAT CTT ATA GGG TAA ACA TC	
* <i>see</i>	SEE-3b	CAG TAC CTA TAG ATA AAG TTA AAA CAA GC	178
	SEE-2c	TAA CTT ACC GTG GAC CCT TC	
* <i>tst</i>	TST-3	AAGCCCTTTGTTGCTTGCG	445
	TST-6	ATCGAACTTTGGCCATACTTT	
* <i>eta</i>	ETA-3b	CTAGTGCATTTGTTATTCAAGACG	119
	ETA-4b	TGCATTGACACCATAGTACTTATTC	
* <i>etb</i>	ETB-3b	ACG GCT ATA TAC ATT CAA TTC AAT G	262
	ETB-4b	AAA GTT ATT CAT TTA ATG CAC TGT CTC	
** <i>seg</i>	SEG-1	ACGTCTCCACCTGTTGAAGG	400
	SEG-2	TGAGCCAGTGTCTTGCTTTG	
** <i>seh</i>	SEH-1	TCACATCATATGCGAAAGCAG	357
	SHE-2	TAGCACCAATCACCCCTTCC	

\*BECKER; ROTH; PETERS, 1998, \*\*ROSEC; GIGAUD, 2002.



Tabela 2. Distribuição dos genes das exotoxinas e dos *S. aureus* nos setores do hospital.

Genes das exotoxinas	Nº de isolados	(% )	Distribuição por setores dos <i>S. aureus</i> no hospital		
			Ambulatório	Enfermaria	UTI
<i>sea</i>	09	11,4	05	04	-
<i>seb</i>	04	5,1	03	01	-
<i>sec</i>	03	3,8	02	01	-
<i>seg</i>	79	100	31	44	04
<i>seh</i>	10	12,7	06	04	-
<i>eta</i>	01	1,27	01	-	-
<i>tst</i>	03	3,8	02	01	-

Tabela 3. Ribotipos e coagulotipos relacionados em *S. aureus*.

Ribotipos	Nº de isolados	Coagulotipos	Distribuição dos isolados de <i>S. aureus</i> no hospital		
			Ambulatório	Enfermaria	UTI
<b>R1</b>	23	P2	09	14	
<b>R2</b>	01 05 03	P1 P2 P4	06	03	
<b>R3</b>	06 04 01	P1 P2 P4	03	08	
<b>R4</b>	22 01	P1 P3	05	13	05
<b>R5</b>	01	P2	01		
<b>R6</b>	01 01	P1 P2	02		
<b>R7</b>	05	P1	04	01	
<b>R8</b>	01	P2		01	
<b>R9</b>	01 01	P2 P4	01	01	
<b>R10</b>	01	P2		01	
<b>R11</b>	02	P2		02	

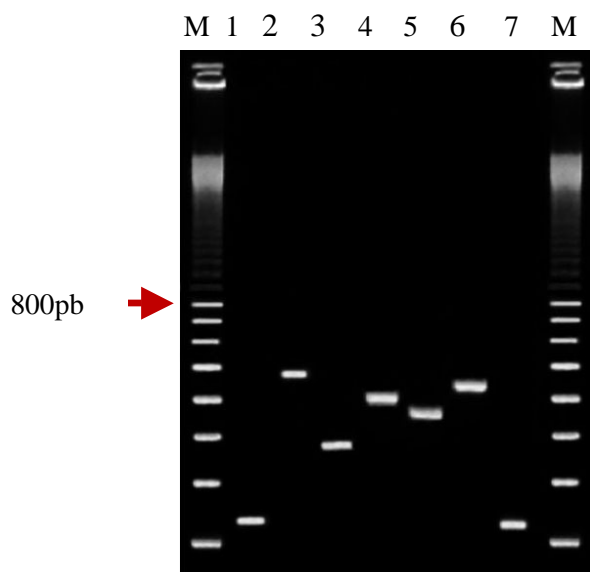


Figura 1. Produto de amplificação da PCR dos genes *sea*, *seb*, *sec*, *seg*, *seh*, *tst* e *eta* nos isolados de *S. aureus* estudados. Linha **M**, marcador de peso molecular (100pb DNA ladder). Linha **1**- *sea*, Linha **2**- *seb*, Linha **3**- *sec*, Linha **4**- *seg*, Linha **5**- *seh*, Linha **6**- *tst*, Linha **7**- *eta*.

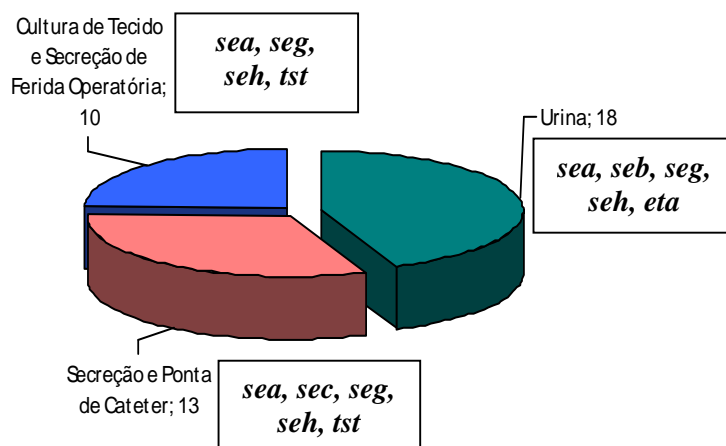


Figura 2. Sítios de infecção mais frequentes por *S. aureus* e os genes das exotoxinas relacionados.

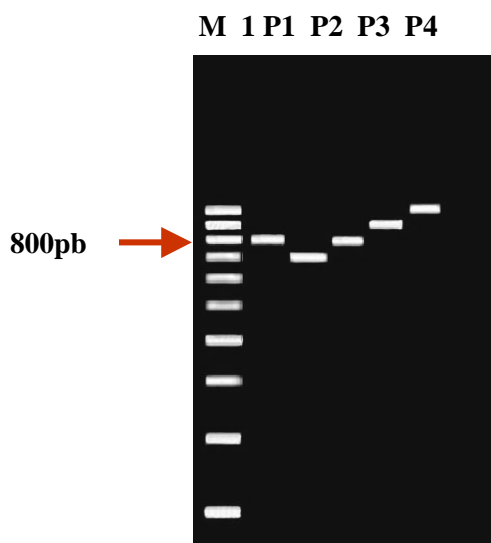


Figura 3. Perfis eletroforéticos representativos dos produtos de PCR do gene *coa* dos isolados clínicos de *S. aureus* estudados. Marcador de peso molecular, linha **M** (100 pb DNA *ladder*). Controle positivo, linha **1** (*S. aureus* ATCC 25923): ~800pb. Coagulotipos: **P1**=~700pb, **P2**=~800pb, **P3**=~900pb e **P4**=~1000pb.

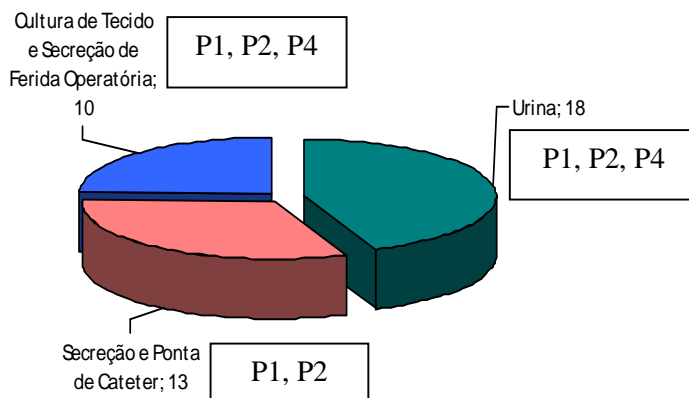


Figura 4. Sítios mais freqüentes de infecção por *S. aureus* e os coagulotipos relacionados.

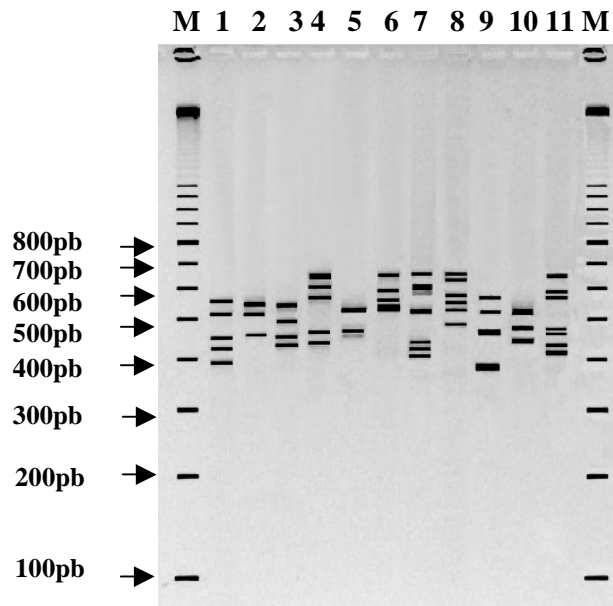


Figura 5. Perfis eletroforéticos representativos da ribotipagem-PCR dos *S. aureus* isolados de amostras clínicas. Marcador de peso molecular (100pb DNA ladder), linha M. Ribotipos 1 a 11.

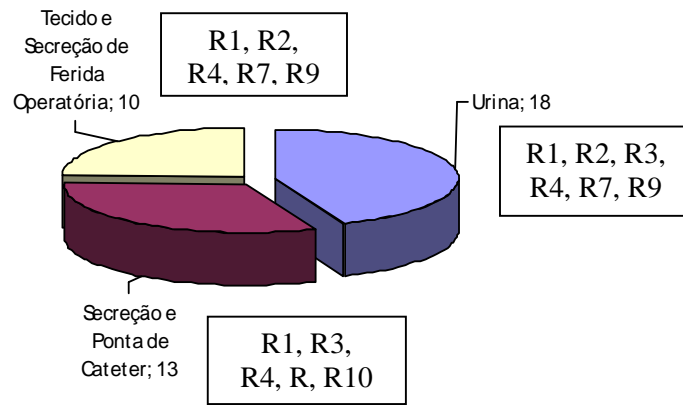


Figura 6. Sítios mais frequentes de infecção por *S. aureus* e os ribotipos relacionados.

**ANEXOS**

## ANEXO A – Parecer do CEP/CPqAM



**Título do Projeto:** "Investigação dos genes responsáveis pela produção da enzima coagulase e exotoxinas em *Staphylococcus aureus*, isolados de amostras clínicas de origens diversas em um hospital público da cidade do Recife-PE"

**Pesquisador responsável:** Mariana de Azevedo Andrade

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

**Data de apresentação ao CEP:** 23/04/2007

**Registro no CEP/CPqAM/FIOCRUZ:** 24/07

**Registro no CAAE:** 0024.0.095.000-07

**PARECER Nº 011/2007**

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. Zúnia Maria de Medeiros**  
Biomédica  
Coordenadora  
CEP/CPqAM/FIOCRUZ

## ANEXO B – Declaração do CEP/CPqAM



**Título do Projeto:** "Investigação dos genes responsáveis pela produção da enzima coagulase e exotoxinas em *Staphylococcus aureus*, isolados de amostras clínicas de origens diversas em um hospital público da cidade do Recife-PE"

**Pesquisador responsável:** Mariana de Azevedo Andrade

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

**Data de apresentação ao CEP:** 23/04/2007

**Registro no CEP/CPqAM/FIOCRUZ:** 24/07

**Registro no CAAE:** 0024.0.095.000-07

## DECLARAÇÃO

O Comitê de Ética em Pesquisas do Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães recebeu, em 17/01/2008, a notificação de modificações propostas no projeto supracitado, no tocante a mudança no título e inclusão de duas técnicas na metodologia.

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 011/2007, emitido em 04/05/2007).

O novo título do projeto passou a ser: "**Tipagem molecular e investigação dos genes responsáveis pela produção da enzima coagulase e exotoxinas em *Staphylococcus aureus*, isolados de amostras clínicas de origens diversas em um hospital público da cidade do Recife-PE**". Com relação as duas técnicas incluídas, elas têm como objetivo: 1- investigar mais uma enterotoxina estafilocócica (SE), denominada SEH através da PCR; 2- Tipagem molecular (Ribotipagem-PCR) que se baseia na análise do polimorfismo da região intergênica 16S-23S dos operons ribossomais dos isolados clínicos de *Staphylococcus aureus*, com o objetivo de acompanhar a dispersão dessas cepas no ambiente hospitalar.

Em reunião realizada em 13/02/2008, tais modificações foram avaliadas, concluindo-se que com essas alterações o projeto continua a não ter implicações éticas, uma vez que os isolados de *Staphylococcus aureus* serão obtidos na rotina do Laboratório do Hospital das Clínicas da UFPE, provenientes de demanda espontânea.

Recife, 10 de abril de 2008

Dr<sup>a</sup> Luciana Brito de Medeiros  
Biomédica  
Coordenadora  
CEP/CPqAM/FIOCRUZ

Campus da UFPE - Av. Moraes Rego, s/n  
CEP 50.670-420 Fone: (81) 2101.2639  
Fax: (81) 3453.1911 | 2101.2639  
Recife - PE - Brasil  
comitedeetica@cpqam.fiocruz.br

Centro de Pesquisas  
AGGEU  
MAGALHÃES

FIOCRUZ  
Ministério da Saúde