

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Ciências e
Tecnologia Agroindustrial



Dissertação

Caracterização de grupos *agr* e sua relação com perfil enterotoxigênico e antimicrobiano em *Staphylococcus aureus* isolados de diferentes origens

Milena Tomasi Bassani

Pelotas, 2009.



Caracterização de grupos *agr* e sua relação com perfil enterotoxigênico e antimicrobiano em *Staphylococcus aureus* isolados de diferentes origens

Milena Tomasi Bassani

2009

MILENA TOMASI BASSANI

Caracterização de grupos *agr* e sua relação com perfil enterotoxigênico e antimicrobiano em *Staphylococcus aureus* isolados de diferentes origens

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Agronomia “Eliseu Maciel” da UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Wladimir Padilha da Silva

PELOTAS

2009

Dados de catalogação na fonte:

(Marlene Cravo Castillo – CRB-10/744)

B317c Bassani, Milena Tomasi

Caracterização de grupos agr e sua relação com perfil enterotoxigênico e antimicrobiano em *Staphylococcus aureus* isolados de diferentes origens / Milena Tomasi Bassani ; orientador Wladimir Padilha da Silva - Pelotas, 2009.-68f. ; il..-Dissertação (Mestrado) –Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2009.

1. *Staphylococcus aureus* 2.Cepas multiresistentes 3.Accessory gene regulator 4.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Wladimir Padilha da Silva (UFPel)

Prof. Dr. Eliezer Àvila Gandra (UFPel)

Profa. Dra. Márcia Monks Jantzen (UFPel)

*À minha mãe, Marilene Tomasi Bassani,
por estar sempre presente, por ser um exemplo,
mulher guerreira, dona de casa, amiga,
e acima de tudo: mãe,
dedico mais essa etapa da minha vida, porque MÃE
“só o amor constrói pontes indestrutíveis”.*

AGRADECIMENTOS

À Deus, muito obrigada por me dar o que eu precisava.

Aos meus pais, Luiz Alberto e Marilene, por estarem sempre presentes, me apoiarem em todos os momentos difíceis e em minhas decisões, e por acima de tudo, formarem o meu caráter.

À minha irmã, Natalia, por ser metade de mim e por estar sempre lá quando eu preciso.

Aos meus amados animais, os meus gatos, Horácio e Dionísio, pelo amor silencioso, por sua paciência e por darem muito mais que recebem.

Ao meu avô, Atílio, e meu tio, Mauro Vicente, pelo apoio e a imensa torcida.

Ao Rafael, meu cunhado, por apoiar a minha metade quando eu não estava presente.

Ao professor, Wladimir, meu querido orientador, pela força, confiança, por não me deixar desanimar em tantos momentos e pela dedicação demonstrada para o meu amadurecimento profissional.

À Universidade Federal de Pelotas/FAEM/DCTA pela oportunidade de realizar o curso de Pós-Graduação.

À Coordenação de Apoio ao Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

À Professora Dra. Agnes de Sá Ribeiro pelo fornecimento das cepas padrão de *Staphylococcus aureus*.

À Universidade Federal de Lavras, na pessoa do professor Luiz Augusto Nero, pelo fornecimento das cepas de *Staphylococcus aureus* oriundas de queijo Tipo Minas Frescal e leite de vacas mastíticas.

Aos amigos, do Centro de Biotecnologia da UFPel/FAEM/DCTA, pela disponibilização do material e dos momentos de descontração.

As amigas, Andréia e Kátia, por se importarem, me escutarem e enxugarem as minhas lágrimas tantas vezes.

À amiga, Denise, por me fazer companhia nos finais de semana no campus, pelos estudos até altas horas da madrugada, lanches divididos, pelas inúmeras horas de descontração, apoio, palavras de carinho e por sua amizade.

À Gabriela, pela ajuda na execução do trabalho, até nos finais de semana no campus, especialmente na extração de DNA, e pelas horas de risadas.

À amiga, Natalia, pelas longas conversas, pelos picolés e o “solzinho” divididos depois do almoço, estudos, horas de descontração e por sua amizade.

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Ana, Caroline, Celso, Élen, Greici, Janaína, Júlia, Karla, Lauri, Marcelo, Márcia Araújo, Márcia Mata, Rodrigo, Simone, Tatiane e Valmor, pelo carinho, apoio, incentivo, ajuda quando necessário e os momentos de grandes risadas e descontração.

Aos amigos, Raquel e Daniel, por estarem presentes e dividirem comigo momentos de alegria e tristeza, sem contar as horas de risada e descontração.

As minhas amigas veterinárias, Elizabeth, Karina, Luciana e Rosema, muito obrigada pelo apoio e por sua amizade.

Ao William, pelo incentivo e paciência no começo dessa jornada.

A todos não citados, mas que participaram, torceram, e contribuíram de alguma forma para a execução desse projeto, muito obrigada.

RESUMO

BASSANI, M. T. M. S. **Caracterização de grupos *agr* e sua relação com perfil enterotoxigênico e antimicrobiano em *Staphylococcus aureus* isolados de diferentes origens.** 2009. 70f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Agronomia “Eliseu Maciel”, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

O *accessory gene regulator* (*agr*) é um regulador global de fatores de virulência em *S. aureus*, como as enterotoxinas estafilocócicas (EE), responsáveis pela intoxicação alimentar estafilocócica. São conhecidos quatro distintos grupos *agr* devido ao polimorfismo na sequência dos aminoácidos de *agrC* e *agrD*. Na literatura descreve-se relação entre fatores de virulência, patogenias, hospedeiro preferencial e perfil de resistência a antibióticos com grupos *agr*. Neste contexto, objetivou-se caracterizar grupos *agr* através de bplex PCR, e relacioná-los com os perfis enterotoxigênico e antimicrobiano de cepas de *S. aureus* isoladas em alimentos e leite de vacas mastíticas. Para caracterização dos grupos *agr* foram utilizadas 115 cepas, sendo 30 isoladas em leite de vacas mastíticas e 85 em diversas fontes de alimentos. Para a relação entre grupos *agr* e produção de enterotoxina foram utilizadas 14/85 cepas previamente caracterizadas quanto à presença de alguma enterotoxina (*eea*, *eeb*, *eec*, *eed* e *cluster egc*), já para determinar o perfil de resistência a antibióticos utilizaram-se 71/115 cepas. Observou-se uma prevalência do grupo *agr* II, com 19,1% (22/115 cepas), seguido do *agr* I, com 8,6% (10/115 cepas), *agr* III 7,8% (9/115 cepas), e *agr* IV, 6,0% (7/115 cepas). Entre as cepas isoladas em leite de vacas com mastite houve predomínio do grupo *agr* I, com 20% (6/30 cepas); já nas cepas isoladas de diversas fontes de alimentos observou-se prevalência do grupo *agr* II, com 32,7% (18/85 cepas), especialmente entre as provenientes de carne de frango. Entre as 14/85 cepas que carregavam genes de enterotoxinas, a maioria que albergava o *cluster egc* (70%), pertencia ao grupo *agr* II, enquanto nenhuma relação foi observada com aquelas que possuíam os genes para as EE clássicas (*eea*, *eeb*, *eec*, *eed*). Com relação ao perfil de resistência antimicrobiana, 100% das cepas isoladas de leite de vacas com mastite e das diversas fontes de alimentos apresentaram resistência à penicilina, ampicilina, cefoxitina e vancomicina. Observou-se relação entre cepas isoladas de alimentos, que eram resistentes à vancomicina e grupo *agr* II, entretanto, nenhuma relação foi observada entre perfil antimicrobiano e grupos *agr* entre as cepas isoladas em leite de vacas com mastite. Através destes resultados demonstra-se a prevalência do grupo *agr* II entre as cepas isoladas de alimentos e do grupo *agr* I em cepas isoladas de leite de vacas mastíticas. Além disso, nas cepas que carregam o *cluster egc* houve predominância do grupo *agr* II, podendo indicar um grupo clonal entre essas. Outro resultado relevante obtido neste estudo foi a elevada taxa de cepas de *S. aureus* multiresistentes isoladas em alimentos, o que ressalta a importância da disseminação de cepas multiresistentes entre os alimentos.

Palavras chaves: *accessory gene regulator*, *Staphylococcus aureus*, enterotoxinas, cepas multiresistentes.

ABSTRACT

BASSANI, M. T. M. S. **Caracterização de grupos *agr* e sua relação com perfil enterotoxigênico e antimicrobiano em *Staphylococcus aureus* isolados de diferentes origens.** 2009. 70f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Agronomia “Eliseu Maciel”, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

The accessory gene regulator (*agr*) is a *S. aureus* global regulator of virulence factors, as the staphylococcal enterotoxins (SE), responsible for the staphylococcal food poisoning. There are four different *agr* groups due to the polymorphism in the amino acids sequence of the *agrC* and *agrD*. In the literature is described a relationship among *agr* groups and virulence factors, diseases, preferential host and antibiotic resistance. In this context, it was aimed to characterize the *agr* groups through biplex PCR, and relationship among *agr* groups, enterotoxigenic and antimicrobial profiles of *S. aureus* isolated from foods and bovine mastitis milk. A total of 115 strains were used to characterize the *agr* groups, being 30 isolated from bovine mastitis milk and 85 isolated from several sources of foods. To assess the relationship between *agr* groups and enterotoxin production were used 14/85 strains previously characterized for the presence of some enterotoxins (*sea*, *seb*, *sec*, *sed* e *cluster egc*). To determine the profile of antibiotics resistance were used 71/115 strains. We observed a prevalence of *agr* group II with 19.1% (22/115 strains), followed by the *agr* I with 8.6% (10/115 strains), *agr* III with 7.8% (9 / 115 strains), and *agr* IV with 6.0% (7 / 115 strains). Among the strains isolated from bovine mastitis milk *agr* group I was prevailed with 20% (6/30 strains), whereas in the strains isolated from several food sources was observed prevalence of *agr* group II with 32.7% (18/85 strains), especially among those from chicken meat. Among the 14 strains (14/85) that contained enterotoxin genes, the majority of them contained the *cluster egc* (70%) belonged to *agr* II, whereas no relationship was found with those who had the genes for the classical SE (*sea*, *seb*, *sec*, *sed*). Considering the antibiotic resistance 100% of bovine mastitis milk strains and from various sources of food were resistant to penicillin, ampicillin, cefoxitin, and vancomycin. Relationship was observed between food strains, which were resistant to vancomycin and *agr* II, however, no relationship was found between antibiotic profile and *agr* groups among the strains isolated from bovine mastitis milk. These results demonstrated the prevalence of *agr* II among food strains and *agr* I among bovine mastitis milk strains. Moreover, the strains that carried the *cluster egc* were predominant *agr* II, which could indicate the occurrence of a clonal group among those. Another important result obtained in this study was the high rate of *S. aureus* multiresistant strains isolated from food, which emphasizes the importance of dissemination of these strains among foods.

Keywords: *accessory gene regulator*, *Staphylococcus aureus*, enterotoxin, multiresistant strains.

Lista de figuras

Figura 1: Representação esquemática do <i>locus agr</i>	23
Figura 2: Região de anelamento dos <i>primers</i>	34
Figura 3: Eletroforese em gel de agarose 1,2%, de produtos de PCR realizada com DNA de <i>S. aureus</i> padrão para os grupos <i>agr</i> I e <i>agr</i> II	36
Figura 4: Eletroforese em gel de agarose 1,2%, de produtos de PCR realizada com DNA de <i>S. aureus</i> padrão para os grupos <i>agr</i> III e <i>agr</i> IV	37

Lista de Tabelas

Tabela 1: Origem e número de cepas de <i>Staphylococcus aureus</i>	31
Tabela 2: Sequência dos <i>primers</i> utilizados para detecção dos grupos <i>agr</i>	33
Tabela 3: Grupos <i>agr</i> em cepas de <i>S. aureus</i> provenientes de diferentes fontes de alimentos, isoladas no sul do Rio Grande do Sul.....	38
Tabela 4: Grupos <i>agr</i> em cepas de <i>S. aureus</i> provenientes da região de Viçosa, MG	38
Tabela 5: Origem, número de cepas e genes das enterotoxinas	41
Tabela 6: Perfil antimicrobiano de cepas de <i>S. aureus</i> isoladas em leite de vacas com mastite.....	43
Tabela 8: Perfil de resistência a antibióticos de cepas de <i>S. aureus</i> isoladas em diversos alimentos, no sul do Rio Grande do Sul.....	46

Lista de abreviaturas e siglas

AFLP- *Amplified Fragment Length Polymorphism*

agr- *accessory gene regulator*

agrA- gene codificador AgrA

agrB- gene codificador AgrB

agrC- gene codificador AgrC

agrD- gene codificador AgrD

AIP- Peptídeo Autoindutor

AMP- Ampicilina

ArlSR- *autolysis related locus*

BHI – Caldo infusão cérebro coração

CFL- Cefalotina

CFO- Cefoxitina

CLI- Clindamicina

CLO- Clorafenicol

CLSI- *Clinical and Laboratory Standards Institute*

DNA – Ácido desoxirribonucléico

EE – Enterotoxina estafilocócica

eea – gene codificador da enterotoxina A

eeb - gene codificador da enterotoxina B

eec - gene codificador da enterotoxina C

eed - gene codificador da enterotoxina D

eee- gene codificador da enterotoxina E

eeg- gene codificador da enterotoxina G

eelh- gene codificador da enterotoxina “like” H

eei- gene codificador da enterotoxina I

eelK- gene codificador da enterotoxina “like” K

eell- gene codificador da enterotoxina “like” L

eelm- gene codificador da enterotoxina “like” M

eeln- gene codificador da enterotoxina “like” N

eelo- gene codificador da enterotoxina “like” O

eelp- gene codificador da enterotoxina “like” P

eelq- gene codificador da enterotoxina “like” Q

eelr- gene codificador da enterotoxina “like” R

eelu- gene codificador da enterotoxina “like” U

ERI- Eritromicina

ermA- gene codificador de resistência a eritromicina

GEN- Gentamicina

GISA- *Staphylococcus aureus* com resistência intermediária a glicopeptídeos

hld- gene codificador da hemolisina A

IgG- Imunoglobulina G

INCSSN- *International Nomenclature Committe for Staphylococcal Superantigen Nomenclature*

mecA- gene codificador de resistência para a meticilina

MLST- *Multilocus sequencie typing*

MRSA- *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina

MRSA-HA- *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina- hospital adquirido

MRSA-CA- *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina- comunidade adquirida

msrA- gene codificador de resistência aos macrolídeos

msrB- gene codificador de resistência aos macrolídeos

NCCLS- *National Committe for Clinical Laboratory Standards*

OXA- Oxacilina

PBS- Proteína Fixadora de Penicilase

PCR - *Polymerase Chain Reaction*

PEN- Penicilina

RAP- Proteína Ativadora de RNA III

RDC- Resolução da Diretoria Colegiada

RFLP- *Restriction Fragment Length Polymorphism*

RIP- Peptídeo Inibidor de RNA III

RNA- ácido ribonucleotideo

sae- S. aureus exoprotein expression

S. aureus – Staphylococcus aureus

SDS- Dodecil sulfato de sódio

spa- gene codificador da proteína A

srrAB- Staphylococcal respiratory response

SSCmec- Staphylococcal Cassete Chromosome mec

SUT- Sulfazotrim

TCRS- Sistema regulador de dois componentes

TET- Tetraciclina

TRAP- Proteína de membrana associada à RAP

TSA- Agar Trypticase de soja

TSST-1- Toxina da Síndrome do Choque Tóxico

van- gene codificador de resistência a vancomicina

VAN- Vancomicina

VISA- *Staphylococcus aureus* com resistência intermediária a vancomicina

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	14
OBJETIVO	16
1. OBJETIVO GERAL.....	16
2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
1. <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>	17
2. ENTEROTOXINAS ESTAFILOCÓCICAS: A CAUSA DA INTOXICAÇÃO ALIMENTAR	18
3. IMPORTÂNCIA DA MASTITE NA INTOXICAÇÃO ALIMENTAR ESTAFILOCÓCICA	21
4. <i>ACCESSORY GENE REGULATOR (AGR)</i>	22
5. <i>S. AUREUS</i> E A RELAÇÃO COM ANTIBIÓTICOS.....	26
MATERIAIS E MÉTODOS	31
1. MATERIAL.....	31
1.1. Cepas bacterianas.....	31
1.2. Antibióticos	32
2. MÉTODOS.....	32
2.1. Extração de DNA.....	32
2.2. Estimativa do DNA obtido.....	33
2.3. Amplificação dos grupos <i>agr</i>	Erro! Indicador não definido.
2.4. Reação biplex-PCR.....	34
2.5. Visualização e análise dos produtos amplificados	35
2.6. Antibiograma	35
RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
1. PREVALÊNCIA DE GRUPOS <i>AGR</i>	36
2. RELAÇÃO ENTRE ENTEROTOXINAS E GRUPOS <i>AGR</i>	40
3. PERFIL DE SENSIBILIDADE A ANTIBIÓTICOS E RELAÇÃO COM GRUPOS <i>AGR</i>	43
CONCLUSÕES	50
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51

INTRODUÇÃO

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) é um patógeno altamente versátil, que causa severas enfermidades em humanos e em animais. Dentre elas, destaca-se a intoxicação alimentar, que é o resultado da ingestão de alimentos contaminados por enterotoxinas estafilocócicas (EE), sendo a terceira maior causa de enfermidade transmitida por alimento no mundo (BALABAM E RASSOLY, 2000; BRONNER et al., 2004).

Vários alimentos são capazes de causar intoxicação, mas o leite e seus derivados são os mais envolvidos em surtos. Um dos fatores que mais contribuem para isso é a elevada incidência de mastite bovina nos rebanhos leiteiros, tendo em vista que o principal agente etiológico desta doença da glândula mamária de fêmeas lactantes é *S. aureus* (AIRES-DE-SOUSA et al., 2007; PELES et al., 2007).

Outro aspecto de grande importância é a termoestabilidade das EE, tendo em vista que o tratamento térmico destrói o patógeno, mas não a causa da intoxicação alimentar (BALABAM E RASSOLY, 2000; DINGES et al., 2000).

Diversos fatores de virulência estão envolvidos na patogenicidade de *S. aureus*, o que a torna complexa. Vários pesquisadores têm tentado elucidar seu mecanismo de patogenia, estudando fatores de virulência e reguladores globais. Entre estes, o *accessory gene regulator (agr)* um *locus*, composto de 5 genes (*hld*, *agrA*, *agrB*, *agrC*, *agrD*), dois promotores (P2 e P3) e uma molécula efetora (RNAIII), é o regulador largamente estudado e mais bem caracterizado. O *agr* regula a produção de diversos fatores de virulência entre eles proteínas de superfície, exozimas e toxinas, como as enterotoxinas estafilocócicas, além de participar da formação de biofilmes (JI et al., 1995; AVIRDSON e TEGMARK , 2001; CHEUNG et al., 2004).

São conhecidos quatro distintos grupos *agr*: *I*, *II*, *III* e *IV*, todos determinados pelo polimorfismo da sequência de aminoácido de *AgrD* e *AgrC*. Diversos estudos têm demonstrado relação entre determinado grupo *agr* com hospedeiro preferencial, ou a associação de um grupo com resistência a antimicrobianos, a uma determinada

enfermidade ou a um fator de virulência, além da interação entre grupos (JARRAUD et al., 2000; SHOPSIN et al, 2003).

Com base no exposto, padronizou-se a técnica de bplex PCR para a identificação de grupos *agr*, objetivando-se avaliar sua ocorrência em cepas de *S. aureus* oriundas de diversas origens, bem como estabelecer uma possível relação entre a presença dos distintos grupos e origem (alimento), produção de enterotoxina e perfil de resistência a antibióticos.

OBJETIVO

1. Objetivo geral

Identificar, através da técnica bplex PCR, a presença dos grupos *agr* I, II, III e IV em cepas de *Staphylococcus aureus*, isoladas a partir de diferentes origens.

2. Objetivos específicos

Padronizar a técnica de bplex PCR para a detecção dos grupos *agr* I, II, III e IV em cepas padrão de *S. aureus*.

Avaliar a presença dos grupos *agr* em cepas de *S. aureus* disponíveis no Banco de Cepas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos DCTA/FAEM/UFPel, isoladas de diferentes alimentos na região sul do Rio Grande do Sul (RS),

Relacionar, 14 cepas, pertencentes no Banco de Cepas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos DCTA/FAEM/UFPel, já caracterizadas quanto à presença dos genes das enterotoxinas A,B,C,D e das enterotoxinas do *cluster egc*, com os grupos *agr* encontrados.

Identificar a presença dos grupos *agr* em cepas de *S. aureus* oriundas de leite de vacas mastíticas e de queijo Tipo Minas Frescal, isoladas na região de Viçosa, MG.

Avaliar o perfil de resistência das cepas de *S. aureus*, frente a treze diferentes antibióticos.

Estabelecer relação entre alimento, produção de enterotoxina, perfil de resistência a antibióticos e determinado grupo *agr*.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. *Staphylococcus aureus*

O gênero *Staphylococcus* pertence à família *Micrococcaceae*, apresenta forma de coco e tende a formar agrupamentos semelhantes a cachos de uva, possuindo diâmetro que varia entre 0,5 e 1,5 μm . São Gram-positivos, anaeróbios facultativos, não formadores de esporos, imóveis e capazes de produzir catalase. (BERDGOLL, 1990).

O gênero é composto por 41 espécies (EUZÉBY, 2009), sendo que *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), descoberto em 1880, é considerada a mais virulenta, e o patógeno de maior impacto econômico, causando um amplo espectro de infecções em humanos e animais (SAKAI et al., 2004; COUZINET et al., 2005; DEURENBERG e STOBBERINGH, 2008).

Apresenta natureza ubíqua, sendo seu reservatório primário a pele e membranas mucosas, especialmente a região naso-faríngea de mamíferos e aves. Estima-se que 25 a 40% da população humana carreguem *S. aureus*, o que torna essa espécie, um importante indicador de higiene pessoal e de qualidade de alimentos (INGVALE et al., 2005; LUONG et al., 2006).

Segundo Tseng et al. (2004), em humanos, *S. aureus* é um patógeno oportunista que causa um amplo espectro de enfermidades que incluem: infecções cutâneas, intoxicação alimentar, endocardites, pneumonia, osteomielite e artrite séptica. Além disso, a emergência de casos de *S. aureus* resistentes a meticilina (MRSA) associados com infecções nosocomiais e comunidade adquirida têm ganhado a atenção de centros de controle de patógenos e dos pesquisadores em todo o mundo (KOREEN, et al., 2004).

Em animais, *S. aureus*, é um importante agente etiológico de mastite em vacas, cabras e ovelhas, causando uma infecção crônica e profunda na glândula mamária de fêmeas lactantes. A mastite causa sérias perdas econômicas para a produção leiteira em todo o mundo e representa um risco para a saúde pública (GILOT et al., 2002; AIRES-DE-SOUSA et al., 2007).

A patogenicidade desse microrganismo ainda não está totalmente elucidada, mas sabe-se que está relacionada a diversas proteínas como adesinas, toxinas e exozimas, que são fortemente reguladas por reguladores globais, durante as fases de crescimento bacteriano (SCHERL et al., 2005).

Dentre seus fatores de virulência, destacam-se: algumas adesinas, como a cápsula de natureza polissacarídica, que contribuem para impedir a fagocitose; proteína A, que apresenta alta afinidade pela região Fc das moléculas de IgG, dificultando a ação do sistema imunológico; exozimas, como a coagulase, responsável pela formação de fibrina, que confere resistência a opsonização e fagocitose (KONEMANN, 2001; TEIXEIRA et al., 2008;).

Além desses, *S. aureus* produz uma série de toxinas extracelulares: as enterotoxinas estafilocócicas (EE), a esfoliatina, a toxina da síndrome do choque tóxico (TSST-1) e as hemolisinas. As EE são as responsáveis pela intoxicação alimentar estafilocócica; as hemolisinas, envolvidas em casos de mastite; a TSST, pela síndrome do choque tóxico; e a esfoliatina é responsável pela síndrome da pele escaldada (DINGES et al., 2000).

A intoxicação alimentar estafilocócica, resultado da ingestão de enterotoxinas pré-formadas em alimentos contaminados com *S. aureus*, é considerada a terceira causa mais comum de doença alimentar no mundo (NEMA et al., 2007).

2. Enterotoxinas estafilocócicas: a causa da intoxicação alimentar

As enterotoxinas estafilocócicas (EE) são proteínas extracelulares de baixo peso molecular (25.000 a 30.000 Daltons), hidrossolúveis, estrutura molecular e atividade farmacológica semelhantes entre si, possuindo, entretanto, propriedades imunológicas distintas (BALABAM E RASSOLY, 2000; ZOCHE, 2005).

São consideradas superantígenos por estimularem a proliferação em larga escala de linfócitos T, ocasionando uma grande liberação de interleucina 2 (IL-2) podendo resultar em choque (LI et al., 2006). Outra característica importante, em segurança de alimentos, é a termoestabilidade das EE, que podem suportar 121°C durante 3 a 8 minutos, resistindo, desta forma, ao processamento térmico. O tempo e temperatura, que as EE resistem, dependem de fatores como pH e concentração salina (DINGES et al., 2000; FRANCO E LANDGRAF, 2002; PELES et al., 2007).

São conhecidos 18 diferentes tipos de enterotoxinas, nomeadas em ordem alfabética pela ordem de descobrimento: as enterotoxinas clássicas, nomeadas de EEA até EEE, e as “like” ou “novas” enterotoxinas ou superantígenos EEG até EEU (FISCHER et al., 2009). Segundo Chiang et al. (2008), o *International Nomenclature Committee for Staphylococcal Superantigen Nomenclature* (INCSSN), recomenda que somente os superantígenos que causem emese por administração oral em macacos sejam designados de EE, e que o restante seja designado de enterotoxina estafilocócica “like” ou “novas” (EEL), pela falta de propriedades eméticas ou pela falta de testes.

As enterotoxinas clássicas são mais freqüentes em surtos, sendo responsáveis por 95% deles, sendo EEA a mais comum, seguida da EED e EEB (BALABAN E RASSOLY, 2000; OMOE et al., 2002). Autores como Chiang et al. (2008), afirmam que esta freqüência de identificação pode estar diretamente relacionada aos métodos de diagnósticos, os quais, em sua grande maioria, detectam apenas as EE clássicas.

Normanno et al. (2007), reportam uma correlação entre enterotoxina e origem do isolado. Associam cepas de origem humana com as enterotoxinas A e B, e cepas provenientes de contaminação animal, as enterotoxinas C e D, e ressaltam a importância do manipulador e da questão zoonótica de *S. aureus* na intoxicação alimentar estafilocócica.

Um *cluster* dentro das “novas” enterotoxinas tem despertado a atenção entre pesquisadores: o *cluster egc*, composto pelos genes das enterotoxinas *eeg*, *eei*, *eelm*, *eeln*, *eelo*, e dois pseudogenes ϕ ent1 e ϕ ent2, que ao se fundirem originam a EELU. As enterotoxinas do *cluster egc* podem ser divididas em três filogrupos: (i) *egc1* que carrega os genes *eei*, *eeg*, *eelo*, *eelm*, *eeln*, ϕ ent1, ϕ ent2, (ii) *egc2* que contém os genes *eei*, *eeg*, *eelo*, *eelm*, *eeln*, ϕ ent1, ϕ ent2 e o *eelu*, (iii) *egc3* com os genes *eei*, *eeg*, *eeln*, *eelu* (OMOE et al., 2002; BLAIOTTA et al., 2006; THOMAS et al., 2006).

Diversos autores têm encontrado elevado índice das EE desse *cluster* em seus alvos de estudo, como é o caso de Pereira et al. (2009) que observaram em 69% dos isolados pelo menos um gene do *cluster egc*. Já Zocche et al. (2009) encontraram o *cluster egc* completo em 64% das cepas de *S. aureus* isoladas em carcaças de frango. Esse elevado índice indica a necessidade de maiores

investigações sobre a real participação desse *cluster* nos casos de intoxicação alimentar.

Conforme Zhang e Stewart (2000) as enterotoxinas são similares em estrutura e atividade biológica, mas diferem em localização genética, quantidade de toxina e mecanismo de regulação gênica. Como exemplo, os autores citam duas EE, EEA e EEB. A primeira é expressa em pouca quantidade, não regulada por reguladores globais e localizada num profago; a segunda é cromossomal, expressa em grande quantidade e regulada por um *accessory gene regulator (agr)*.

Os sintomas da intoxicação alimentar estafilocócica surgem dentro de uma a seis horas após a ingestão do alimento contaminado, e incluem: diarreia, dor abdominal e, tipicamente, vômito. A doença é autolimitante, com sintomas durando em média 24 a 48 horas, o que muitas vezes torna os índices de hospitalização e notificação baixos (SILVA, 1998; JORGENSEN et al., 2005;)

Estima-se que seja necessário 1 µg de enterotoxina para causar intoxicação alimentar, mas as quantidades são variáveis entre indivíduos e dependem da quantidade de alimento contaminado ingerido, do tipo de enterotoxina, do peso e do estado imunológico do indivíduo (FREIRAS et al., 2004). Com relação a quantidade de microrganismo, Franco e Landgraff (2002) relatam que 10⁵ a 10⁶ UFC (Unidades Formadoras de Colônias) de *S. aureus* por grama de alimento, sejam necessárias para causar intoxicação alimentar.

Vários alimentos são incriminados em surtos, mas aqueles que envolvem uma grande manipulação e os derivados do leite são mais frequentemente envolvidos (PELES et al., 2007).

Carmo et al. (2002) relatam um surto, no Brasil, envolvendo EEA, EEB e EEC em queijo tipo Minas Frescal e outro envolvendo leite cru, onde as enterotoxinas incriminadas foram EEC e EED. Já, no Japão, Jorgensen et al. (2005) relataram EEH em um surto envolvendo purê de batatas feito à base de leite cru. Chiang et al. (2008) avaliando 147 isolados de *S. aureus* de pacientes envolvidos em surtos, encontraram, por análise de PCR (Reação de Polimerase em Cadeia), além das enterotoxinas clássicas, as “novas” enterotoxinas: EEI, EELP, EELK, EELO, EELU, EELN, EELM, EELQ, EELH, EELL e EELR.

As técnicas preconizadas pela ANVISA na RDC nº 12/2001, para a detecção de estafilococos coagulase positiva e confirmação de sua possível patogenicidade, envolvem isolamento em Ágar Baird Parker e teste da coagulase, onde se

estabelece uma relação entre a produção de coagulase e a capacidade de produzir enterotoxina. Já autores como Lancette e Bennett (2001), afirmam que o potencial risco de intoxicação estafilocócica somente pode ser determinado após a confirmação da enterotoxigenicidade do microrganismo isolado e/ou após a demonstração da presença da enterotoxina no alimento.

3. Importância da mastite na intoxicação alimentar estafilocócica

S. aureus é o agente etiológico mais comum da mastite bovina, doença de relevância e que causa inúmeras perdas para a indústria leiteira, além de risco à saúde do consumidor (TEDESCHI et al., 2009).

A mastite pode se apresentar na forma clínica ou subclínica. A forma clínica é de mais fácil controle para a indústria, enquanto que a forma subclínica, na qual, a doença se manifesta de forma silenciosa, é a principal forma de contaminação do leite cru (FAGUNDES, 2007).

Estudos envolvendo a origem da transmissão do patógeno apontam como principais fontes os equipamentos de ordenha, de resfriamento, manipuladores e a transmissão animal-animal e humano-animal (ZADOKS et al., 2002).

A patogenicidade de *S. aureus* na mastite bovina ainda não está totalmente elucidada, mas é dependente da produção de um elevado número de exotoxinas, proteínas de superfície (como a proteína A) e do polissacarídeo extracelular (VASUDEVAN et al., 2003; KATSUDA et al., 2005). Segundo Smith et al. (2005), entre as enterotoxinas encontradas em leite de animais com mastite as EEC e EED estão presentes em 10 a 30% do leite bovino, enquanto que em leite caprino, a incidência de EED e EEC é de 35% e 22%, respectivamente.

Pesquisadores como Boerema et al. (2006), encontraram em 61,9% dos isolados de *S. aureus* oriundos de leite de vacas mastíticas, a presença de genes de enterotoxinas clássicas e “novas”. No Japão, a presença dos genes que codificam para as EEC, EEG e EEI em cepas de *S. aureus* provenientes de leite de vacas mastíticas foi de 67,8% (KATSUDA et al., 2005). Boynukara et al. (2008) avaliando 25 cepas de *S. aureus* provenientes de leite de vacas com mastite subclínica, pelo teste da aglutinação em látex, encontraram EEA em 23,6% , EEB em 1,9% e 9 cepas produtoras de EEC ou EED.

4. Accessory Gene Regulator (*agr*)

A patogenicidade de *S. aureus* é um processo complexo que envolve diversos componentes extracelulares e proteínas de parede que são expressas durante diferentes estágios da infecção (CHEUNG et al., 2004). A expressão de diversos fatores de virulência está sobre o controle de duas famílias de reguladores globais: Sistema regulador de dois componentes (TCRS) e o Regulador acessório staphylococcal (*sarA*) e seus homólogos (BRONNER et al., 2004).

O TCRS é composto pelos reguladores: *locus accessory gene regulator (agr)*, *S. aureus exoprotein expression (sae)*, *Staphylococcal respiratory response (srrAB)*, *Autolysis-related locus (ArlSR)* e o *LytRS*. O segundo sistema, *sarA*, é composto do *locus sarA* e seus homólogos (AVIRDSON e TEGMARK, 2001).

O *locus agr* é, do TCRS, o sistema mais bem descrito e caracterizado em *S. aureus*. Consiste de dois distintos promotores (P2 e P3) e cinco genes *hld*, *agrA*, *agrB*, *agrC* e *agrD*, que codificam dois divergentes transcritoires (RNAII e RNAIII) (YARWOOD et al., 2002; GOERKE et al., 2003; BRONNER et al., 2004).

O gene *agrA* codifica a proteína AgrA (34kDa) que funciona como um regulador citoplasmático; *agrC*, codifica a proteína transmembrana AgrC (46kDa), que é um receptor histidina kinase, e juntos, AgrA e AgrC, formam o sistema clássico de dois componentes. AgrB (26kDa), uma proteína integral de membrana, codificada por *agrB*, e AgrD, um protopeptídeo do gene *agrD*, geram o AIP (peptídeo autoindutor), envolvido no sistema de *quorum sensing* de *S. aureus*. O AIP é um peptídeo formado por 7 a 9 aminoácidos, sendo que 5 desses contêm um ácido-tiolactona (JI et al., 1995; MULLARKY et al., 2001; GOERKE et al., 2005; NOVICK e GEISINGER, 2008).

O sistema de regulação do *locus agr* ocorre em cascata e é sensível a concentração celular e a quantidade de AIP, por isso, esse *locus* é relacionado ao sistema *quorum sensing* em *S. aureus* (WINZER e WILLIAMS, 2001).

Durante a fase de crescimento exponencial, o gene *agrD* codifica um protopeptídeo, AgrD, maturado por digestão proteolítica, que se liga a AgrB, proteína ancorada na membrana, e forma uma ligação tioester, sendo secretado para o ambiente extracelular na forma de AIP. Na membrana celular há o receptor AgrC, que se liga a AIP e muda sua conformação através da fosforilação do domínio histidina. O fosfato é transferido para o citoplasma, e se liga ao resíduo de aspartato

presente na proteína AgrA, que então se liga aos promotores P2 e P3, e a outros fatores, aumentando a transcrição do *locus agr* e transcrevendo RNAIII, molécula efetora da regulação do *agr* (Fig. 1) (BALABAN e NOVICK, 1995; ARVIDSON e TEGMARK, 2001; BRONNER et al., 2004; CHEUNG et al., 2004; GOERKE et al., 2004; SAKOULAS, 2006).

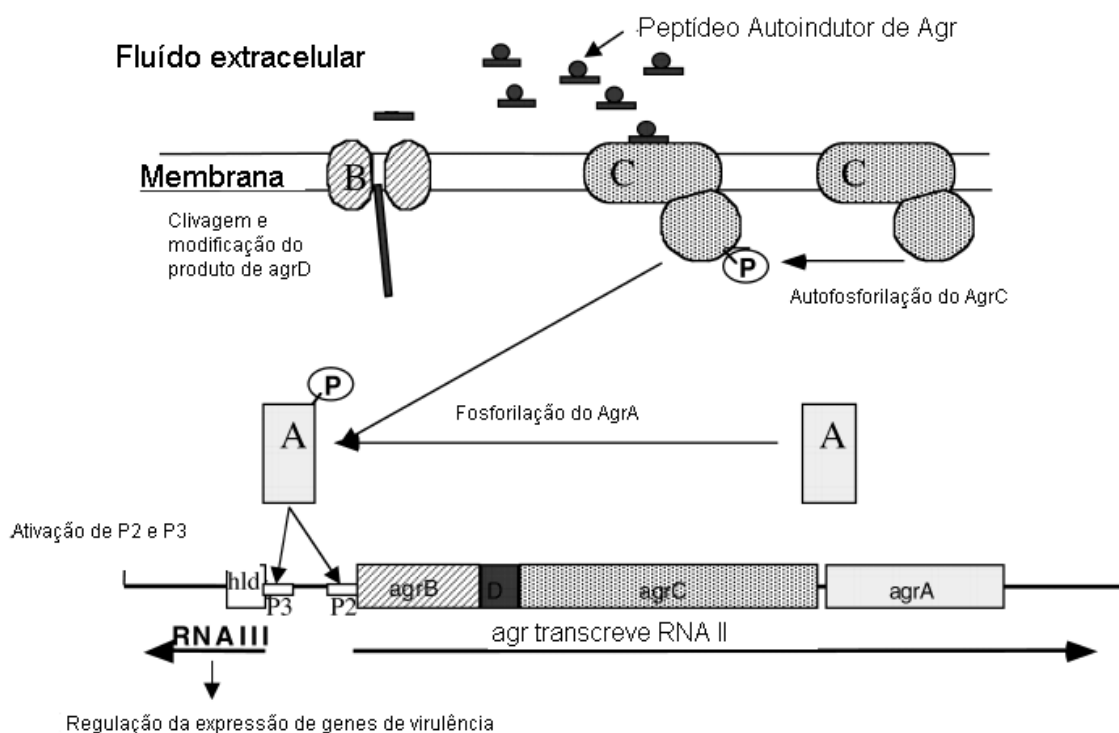


Figura 1: Representação esquemática dos eventos *locus agr*
 Fonte: Adaptado de Arvidson e Tegmark, 2001

Segundo Qazi et al. (2001), RNAII é um mRNA policistrônico que transcreve os genes *agrB* e *agrD*, requeridos para a síntese de AIP, e conseqüentemente, *agrA* e *agrC*. Já RNAIII ativa o nível de transcrição dos genes, além de transcrever o gene da δ - hemolisina.

Autores como Sakoulas (2006), relatam que a expressão de δ - hemolisina pode servir para avaliação qualitativa da expressão de RNAIII, já que a produção e a detecção de δ - hemolisina indicam que RNAIII foi traduzido e, desta forma, o *locus agr*. Já a interpretação da expressão negativa de δ - hemolisina é mais complicada, porque pode indicar que houve redução nos níveis de RNAIII ou sua ausência em

decorrência da perda ou mutação do *locus agr*, ou que houve supressão desse sistema, por outros reguladores.

Um mecanismo alternativo de ativação do *locus agr*, sugerido por Balaban et al. (1995), é conhecido como RAP (proteína ativadora de RNAIII), que é uma proteína de 38 kDa contendo uma seqüência terminal NH₂. Essa proteína pode ativar a síntese de RNAIII de forma independente do *agr*, ativando a sua produção via seu sensor TRAP, proteína de membrana associada a RAP (BALABAN e NOVICK, 1995; KOREM et al., 2003).

Gov et al. (2001), relatam que RAP é secretada durante todas as fases de crescimento bacteriano, e ativa a fosforilação da proteína TRAP, ativando, conseqüentemente, o promotor P2 e a tradução de *agrBDCA*, e assim a formação de RNAIII. Balaban et al. (1995) sugerem que AIP produzido no meio da fase exponencial, inibe a fosforilação de TRAP.

Um inibidor potencial do *locus agr*, RIP (peptídeo inibidor de RNAIII) descrito por Balaban e Novick em 1995 em culturas de *S. aureus* coagulase-negativa, compete com RAP na indução da fosforilação de TRAP, inibindo-a (GOV et al., 2001; AVIRDSON e TEGMARK., 2004; LYON e NOVICK, 2004).

Polimorfismo na seqüência do peptídeo autoindutor (AIP) e no seu receptor AgrC, ocasionam a formação de quatro grupos *agr*: I, II, III e IV (JARRAUD et al., 2000; SHOPSIN et al, 2003; CHINI et al., 2006; SAKOULAS, 2006). Ji et al. (1997), sugerem que a hipervariabilidade do *locus agr* envolve a acumulação de mutações.

Diversos autores relatam que o AIP de cepas pertencentes ao mesmo grupo *agr*, ativam a resposta entre si, enquanto cepas de grupos diferentes competem por níveis de expressão, além de poderem inibir o AIP de grupos distintos.

A associação entre determinado grupo *agr* e enfermidades tem sido relatada. Jarraud et al. (2000) verificaram a prevalência do grupo *agr* IV em cepas produtoras de esfoliatina envolvidas na síndrome da pele escaldada. Jarraud et al. (2002) relatam que cepas dos grupos *agr* I e II causam, preferencialmente, doenças mediadas por enterotoxinas como a intoxicação alimentar, e que o grupo *agr* III está envolvido com a síndrome do choque tóxico. Sakoulas et al. (2002) relacionam cepas clínicas, como as isoladas em casos de mastite, ao grupo *agr* I. Outra correlação que tem sido estabelecida com grupos *agr*, envolve resistência a antimicrobianos: Sakoulas et al (2002) relacionam a resistência à vancomicina com

cepas *agr* II e Moise-Broder et al. (2004), cepas MRSA comunidade adquirida, com *agr* III.

Estudos conduzidos por Regassa et al. (1992), Chan et al. (1998) e Ster et al. (2005), demonstram que o locus *agr* é sensível aos sinais ambientais, causando a redução ou repressão da produção de exotoxinas e outros fatores controlados por esse locus.

São conhecidos mais de 40 diferentes fatores de virulência em *S. aureus*, o que por si só, demonstra a complexidade da patogenicidade desse microrganismo. Muitos desses fatores são regulados por *agr*, e por outros globais reguladores, em várias etapas do processo infeccioso. Durante o começo da infecção por *S. aureus* a atividade do *agr* é baixa e as proteínas de superfície, que funcionam como adesinas, são expressas para permitir a colonização. Com o progresso da infecção, *agr* inicia sua atividade, suprimindo a expressão de adesinas e iniciando a produção de exotoxinas, como as enterotoxinas e exoproteínas degradativas (PAPAKYRIACOU et al., 2000; OTTO, 2001; AVIRDSON e TEGMARK, 2004; CHEUNG et al., 2004). Trabalhos envolvendo internalização pelo macrófago de *S. aureus*, como os desenvolvidos por Qazi et al (2001) e Buzzola et al. (2007), apontam que o sistema *agr* facilita o escape ao complexo de ataque a membrana (MAC).

Mutações naturais em cepas de *S. aureus* que causem deleções no locus *agr*, reduzem a persistência de infecções, diminuem a síntese de exotoxinas, reduzem a capacidade de aderência e promovem decréscimo do crescimento intracelular, sugerindo que *agr*, por si só, é um importante fator de virulência (GILLASPY et al., 1995; MULLARKY et al., 2001, YOON et al., 2007). Nesse sentido, Goerke et al. (2003), afirmam que o locus *agr* exerce uma regulação positiva na α -hemolisina e negativa na proteína A e nas proteínas ligadas a fibronectina.

Em microbiologia de alimentos, a produção de enterotoxinas e da enzima coagulase, por cepas de *S. aureus*, tem grande importância, por isso sua relação com o locus *agr* tem sido alvo de estudo. Zhang et al. (1998), descrevem que as enterotoxinas D e J são codificadas pelo plasmídeo pIB485, mas somente EED é regulada por *agr*, não relatando, entretanto, o mecanismo de regulação. EEA e coagulase são reguladas independente da expressão de *agr* (TREMAINE et al. 1993). Já as enterotoxinas B e C, são dependentes da expressão de *agr*, sendo expressas em grande quantidade no final da fase exponencial, o que demonstra,

mais uma vez, a relação entre *agr* e sistema *quorum sensing* (GASKILL e KHAN, 1988; WRIGHT e HOLLAND, 2003).

Outro aspecto muito importante na contaminação de alimentos por *S. aureus*, diz respeito a sua capacidade de formar biofilmes em equipamentos e superfícies. Em relação à participação do sistema *agr* na formação de biofilme por esse microrganismo, cepas que expressam altos níveis de *agr* têm reduzida capacidade de formar biofilmes (BEENKEN et al., 2004; BOLES et al., 2008). Entretanto, Cafiso et al. (2007) observaram que cepas pertencentes ao grupo *agr* II tem alta capacidade de produção de biofilmes.

5. *S. aureus* e a relação com antibióticos

Na última década, o número de microrganismos isolados de alimentos, que são resistentes a antimicrobianos, tem aumentado consideravelmente. O uso desenfreado de antibióticos em animais e em rações implicou no aumento do número de patógenos transmitidos por alimentos que apresentam resistência a antibióticos e a sua transmissão subsequente através de alimentos contaminados. Além disso, mutações espontâneas e falta de pressão seletiva podem ter contribuído para o surgimento de bactérias resistentes em alimentos (PESAVENTO et al., 2007; PERESI et al., 2006; CONTER et al., 2009).

Quando a penicilina foi lançada, em 1944, em torno de 94% dos *Staphylococcus aureus* isolados eram sensíveis, entretanto, em 1950, metade das cepas eram resistentes, e na década de 60 já começaram a aparecer surtos de cepas multiresistentes em hospitais (LIVERMORE, 2000).

Na década de 50, começaram a ser produzidos antibióticos como cloranfenicol, eritromicina, tetraciclina e estreptomicina, para combater bactérias, como *S. aureus* e *E. coli*, resistentes a penicilina, mas com o uso indiscriminado de antimicrobianos, surgiram cepas multiresistentes, que são resistentes a dois ou mais antibióticos. Em 1960 foram desenvolvidas as primeiras cefalosporinas (cefalotina e cefazolina), que inicialmente foram criadas para estabilizar o avanço de *S. aureus* resistente a penicilina. Ainda em 1960, a descoberta que a substituição do grupamento fenilacetil pelo grupo acil poderia impedir o ataque ao anel β -lactâmico contido na penicilina, criou a oxacilina, meticilina e nafcilina, os novos β -lactâmicos.

A seguir, foram criados os aminoglicosídeos como a gentamicina, e os glicopeptídeos como a vancomicina (LIVERMORE, 2000).

A introdução da meticilina dentro da prática médica no começo da década de 60 resultou, rapidamente, em isolados *Staphylococcus* meticilina resistente (MRSA) (FLUIT et al., 2001), sendo o primeiro MRSA reportado por Jevons, em 1961 (McCULLOCH, 2006). Para o tratamento de doenças causadas por cepas MRSA empregou-se, na antibioticoterapia, a vancomicina, que teve seu primeiro caso de resistência reportado por Hiramatsu, em 1996, no Japão (Santos et al., 2007).

A resistência de *S. aureus* aos antibióticos ocorre por mutação em seus genes ou pela aquisição de genes de resistência de outras bactérias da mesma espécie, ou de outras espécies. A resistência pode ser causada por uma variedade de mecanismos: (i) a presença de uma enzima que inativa o antimicrobiano; (ii) presença de uma enzima alternativa à enzima que é inibida pelo antibiótico; (iii) uma mutação no alvo do agente antimicrobiano; (iv) modificação pós-transcricional ou pós-traducional do alvo do agente antimicrobiano; (v) reduzida captação do antimicrobiano; (vi) atividade efluxo; e, (vii) superprodução do alvo do antimicrobiano (FLUIT et al., 2001; ALTERTHUM, 2008).

Os antibióticos β -lactâmicos, como as penicilinas, oxacilina, meticilina, ampicilina, amoxicilina e as cefalosporinas de 1^a, 2^a, 3^a e 4^a geração, são os mais comumente usados na antibioticoterapia. Eles atuam nas proteínas fixadoras de penicilinas (PBPs) que estão envolvidas na síntese da parede celular. A resistência aos β -lactâmicos é causada pela presença de β -lactamases e de mutações nas PBPs, resultando em baixa afinidade aos sítios de ligação dos β -lactâmicos (LIVERMORE, 2000; FLUIT et al., 2001; ALTERTHUM, 2008).

Staphylococcus aureus meticilina resistente é o principal caso de resistência bacteriana no mundo, e uma grande preocupação em saúde pública (APPELBAUM, 2007). Por muitos anos, cepas MRSA foram reconhecidas como patógenos exclusivo de hospitais (MRSA-HA). Porém, muitos estudos têm documentado a disseminação de MRSA em alimentos, na comunidade, (*S. aureus* meticilina resistente-comunidade adquirida MRSA-CA) e em animais de companhia (TENOVER et al., 2006; CARDOSO et al., 2007; NORMANNO et al., 2007; PESAVENTO, et al., 2007; WALTHER et al., 2007; SIMEONI et al., 2008).

A resistência à meticilina e a outros β -lactâmicos, depende da expressão de uma proteína de 78-kDa (PBP2a) codificada pelo gene *mecA*, o qual está localizado

no “staphylococcal cassette chromosome mec” (SCCmec), um elemento genético móvel, incorporado ao DNA de cepas MRSA. São conhecidos sete tipos diferentes SCCmec (tipo I a VII), sendo que os tipos I, IV, V, VI e VII estão envolvidos em resistência somente a β -lactâmicos, enquanto os demais (II e III), por adição de elementos genéticos móveis, como plasmídeos e transposons, podem causar resistência a outros antibióticos. Esses último caso é exemplificado pelo pUB110, que confere resistência também a aminoglicosídeos, e pelo Tn544, que carrega o gene *ermA* conferindo resistência aos macrolídeos (LIVERMORE, 2000; APPELBAUM, 2007; GOULD, 2007; DEURENBERG e STOBBERINGH, 2008).

Análises epidemiológicas de MRSA, envolvendo as técnicas de PFGE e MLST, indicam a disseminação de 5 clones: ibérico, brasileiro, húngaro, New York/Japão e pediátrico (HIRAMATSU et al., 2001; SOLA et al., 2002; RIBEIRO et al., 2007; GORDON e LOWY, 2008).

Kluytmans et al. (1995), relatam um caso de infecção por MRSA em paciente hospitalizado, envolvendo a ingestão de alimento preparado por um portador nasal de MRSA. Outro caso, relatado por Jones et al. (2002), envolve um surto pela ingestão de MRSA proveniente de carne suína assada, contaminada pelo manipulador portador.

Normanno et al. (2007) ressaltam a importância do controle da disseminação de MRSA em alimentos, tendo em vista que pacientes imunocomprometidos podem adquirir infecção por MRSA ao ingerirem essas cepas, as quais podem atingir o sistema circulatório provocando uma septicemia.

O uso de testes fenotípicos para *screening* de cepas MRSA, como os testes de resistência a oxacilina e cefoxitina, dois β -lactâmicos, além dos testes genotípicos, como PCR para detecção do gene *mecA*, são recomendados por Normanno et al. (2007). NCCLS (2005) cita os testes fenotípicos de difusão em disco usando cefoxitina e de concentração mínima inibitória usando oxacilina, como os testes que possuem a melhor correlação com a presença ou ausência do gene *mecA*.

Com o aumento da taxa de isolamento de cepas MRSA, a vancomicina, um glicopetídeo que atua na síntese da parede celular, foi usada como base para terapia anti-MRSA. No ano de 1996, no Japão, foi registrado o primeiro caso de *S. aureus* com sensibilidade intermediária a vancomicina (VISA, ou GISA), em um paciente da pediatria com infecção por *S. aureus* MRSA. Em 2000, foram

encontradas, no Brasil, as primeiras cepas resistentes, em um hospital de referência no Rio de Janeiro (SRINIVASAN et al., 2002; SAKOULAS, 2006; APPELBAUM, 2007; SANTOS et al., 2007).

Embora o mecanismo de resistência de *S. aureus* contra a vancomicina ainda não esteja bem esclarecido, acredita-se que esteja relacionado com o gene *van*, que determina a resistência a esse antimicrobiano em *Enterococcus*, e que, provavelmente, pode transmitir essa resistência por meio de plasmídeos, para *S. aureus* (FLUIT et al., 2001; SRINIVASAN et al., 2002; SANTOS et al., 2007).

A resistência à vancomicina altera o aspecto morfológico das colônias, que apresentam uma aparência bastante heterogênea, dando a impressão visual de contaminação. Além disso, geralmente as cepas produzem coagulase em mais de 4h, portanto, levam mais tempo para apresentar reação positiva no teste de produção dessa enzima (SRINIVASAN et al., 2002; SANTOS et al., 2007).

Sakoulas et al. (2002) e Moise-Broder et al. (2004) relatam a relação entre o grupo *agr* II e cepas resistentes a vancomicina e, esses últimos autores observaram que cepas MRSA pertenciam ao grupo *agr* III.

Por seu papel no controle dos genes de virulência de *S. aureus*, o *locus agr*, tornou-se um alvo importantíssimo na terapia antimicrobiana (VIANELLO, 2006).

Aminoglicosídeos, como a gentamicina, tobramicina, amicacina e estreptomicina, são antibióticos que se ligam ao ribossomo e interferem na síntese protéica. O principal mecanismo de resistência aos aminoglicosídeos é a inativação celular da droga por enzimas que a modificam. As principais enzimas são classificadas em acetiltransferase aminoglicosidase (AAC), nucleotidiltransferase aminoglicosidase (ANT) e fosfotransferase aminoglicosidase (APH). A resistência a gentamicina é mediada por uma enzima bifuncional que exibe atividade AAC(6') e APH(2'), localizada no transposon Tn4001 (FLUIT et al., 2001; ALTERTHUM, 2008).

Os macrolídeos, como a eritromicina e a azitromicina, são antibióticos que inibem a síntese protéica, se ligando na subunidade 50S do ribossomo. A resistência pode ocorrer de três maneiras: por metilação do sítio alvo no ribossomo, codificada pelo gene *erm* (mais comum em *S. aureus*); por bomba de efluxo, mediada pelos genes *msrA* e *msrB*; e, a chamada resistência macrolídeo-lincosamina-estreptogramina B (MLS-B) que também ocasiona modificação no sítio alvo do antimicrobiano (NAWAZ et al., 2000; FLUIT et al., 2001; STEWARD et al., 2005).

As tetraciclina são antibacterianos de amplo espectro, geralmente bacteriostáticos, que se difundem no interior das células do hospedeiro, e ligam-se na subunidade 30S do ribossomo, resultando em inativação da síntese protéica. A resistência à tetraciclina ocorre pela aquisição do elemento móvel contendo o gene *tet*, que codifica uma proteína efluxo, provocando a saída do antibiótico da célula (CHOPRA e ROBERTS, 2001; FLUIT et al., 2001; ALTERTHUM, 2008).

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Material

1.1. Cepas bacterianas

Foram utilizadas 55 cepas de *Staphylococcus aureus* provenientes de diferentes fontes de alimentos, pertencentes ao Banco de Cepas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos da UFPel, 30 cepas de *S. aureus* isoladas em queijo Tipo Minas Frescal, cedidas pela Universidade Federal de Viçosa, e 30 cepas de *S. aureus* isoladas de leite de vacas com mastite, também cedidas pela Universidade Federal de Viçosa (tab. 1).

Quatro cepas padrão de *Staphylococcus aureus* (RN 6390B, USA 100, RN 8846 e RN 4850 - *agr* I, *agr* II, *agr* III e *agr* IV, respectivamente), fornecidas pela Universidade Federal do Rio de Janeiro, cedidos pela Dra. Agnes de Sá, foram utilizadas como controle positivo da Reação de Polimerase em Cadeia (PCR).

As cepas foram mantidas em ágar TSA (ágar tripticase de soja – TSA, Acumedia®) sob refrigeração ($\leq 4^{\circ}\text{C}$), até o momento do uso.

Tabela 1: Origem e número de cepas de *Staphylococcus aureus*

Origem	Número de cepas
Leite de vacas mastíticas	30
Queijo tipo Minas Frescal	30
Carne de frango	38
Charque	02
Embutidos cárneos	11
Queijo Tipo Colônia	04

Foram selecionadas 14 cepas previamente caracterizadas quanto à presença dos genes das enterotoxinas (*eea*, *eeb*, *eec*, *eed* e *cluster egc*), pertencentes ao Banco de Cepas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos da UFPel, para se avaliar a relação entre a presença de enterotoxinas e determinado grupo *agr*.

Para a análise do perfil antimicrobiano utilizaram-se 71 cepas de *S. aureus*. Foram analisados 30 cepas isoladas de carne de frango, 8 de embutidos cárneos, 3 de queijo Tipo Colônia e 30 de leite de vacas mastíticas.

1.2. Antibióticos

Utilizaram-se treze diferentes princípios ativos recomendados para o uso em bactérias Gram-positivas: penicilina (PEN 10U), oxacilina (OXA 1µg), ampicilina (AMP 10µg), vancomicina (VAN 30µg), gentamicina (GEN 10µg), eritromicina (ERI 15µg), tetraciclina (TET 30µg), clindamicina (CLI 2µg), sulfazotrim (SUT 25µg), cloranfenicol (CLO 30µg), cefalotina (CFL 30µg), cefoxitina (CFO 30µg) e ciprofloxacina (CIP 5µg).

2. Métodos

2.1. Extração de DNA

A extração de DNA genômico das cepas de *S. aureus* foi realizada de acordo com o protocolo proposto por Matthews et al. (1997), com modificações.

Primeiramente, transferiu-se uma alçada carregada com a cultura de *S. aureus* proveniente de TSA, após incubação a 37°C por 24 horas, para 100µL de tampão TE-A, até turbidez 1,0 da escala de MacFarland. A lise do peptideoglicano da parede celular ocorria pela adição de 100µL de lisostafina 100µg mL⁻¹ (Sigma Aldrich®) e incubação a 37°C em banho-maria, por 1 hora. Após, adicionou-se 20µL de tampão TE-B, contendo 20% de SDS (Dodecil sulfato de sódio, Invitrogen®), e 3µL de proteinase K (Invitrogen®), para complementar a lise celular, e incubou-se em banho-maria a 37°C por 1 hora. Então, acrescentou-se 200µL de solução NaCl 5M gelado, agitou-se manualmente, e centrifugou-se a 10.000 x g por 15 minutos. Após, transferiu-se o sobrenadante para um novo microtubo, adicionou-se fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1) e centrifugou-se a 10.000 xg por 30 minutos, para separação de proteínas, transferindo-se o sobrenadante para um novo microtubo. A precipitação do DNA foi realizada com 800µL de álcool etílico absoluto gelado, e manutenção em -20°C por aproximadamente 2 horas. Após este período,

foi realizada nova centrifugação, a 10.000 x *g* por 15 minutos, mantendo-se o *pellet* formado. A seguir, lavou-se o *pellet* com álcool etílico 70% e colocou-se para secar em capela de fluxo laminar, a temperatura ambiente, durante 1 hora. Após, ressuspendeu-se o *pellet* com 30µL de água ultrapura estéril. A extração de DNA de cada cepas foi realizada, no mínimo, duas vezes, com cultivos diferentes, sendo todas as amostras de DNA submetidas à amplificação por PCR.

2.2. Estimativa do DNA obtido

Para a quantificação do DNA extraído, uma alíquota de 5µL foi submetida a eletroforese em gel de agarose 1% (Invitrogen®), simultaneamente com o padrão de peso molecular λ DNA/*Hind* III (Invitrogen®). A intensidade da luminescência da amostra de DNA extraída foi comparada visualmente à luminescência das bandas do padrão de peso molecular e a quantidade de DNA (ng µL⁻¹) foi estabelecida comparativamente.

2.3. Primers utilizados para a amplificação dos grupos *agr*

Para a amplificação de seqüências dos grupos *agr* I, II, III e IV utilizaram-se os *primers* forward *Pan-agr*, e reverse *agri*, *agriI*, *agriII* e *agriIV* de acordo com Shopsin et al. (2003) (tab. 2 e Fig.2).

Tabela 2: Seqüência dos *primers* utilizados para detecção dos grupos *agr*

	Seqüência 5'-3'	Pares de bases
<i>Pan-agr</i> *	ATGCACATGGTGCACATGC	
<i>agri</i> **	GTCACAAGTACTATAAGCTGCGAT	440
<i>agriI</i> ***	GTATTACTAATTGAAAAGTGCCATAGC	572
<i>agriII</i> **	CTGTTGAAAAAGTCAACTAAAAGCTC	406
<i>agriIV</i> ***	CGATAATGCCGTAATAC CCG	588

*Primer obtido da seqüência parcial do nucleotídeo *agrB*, ** Primer obtido da seqüência parcial do nucleotídeo *agrD* e *** Primer obtido da seqüência parcial do nucleotídeo *agrC*.

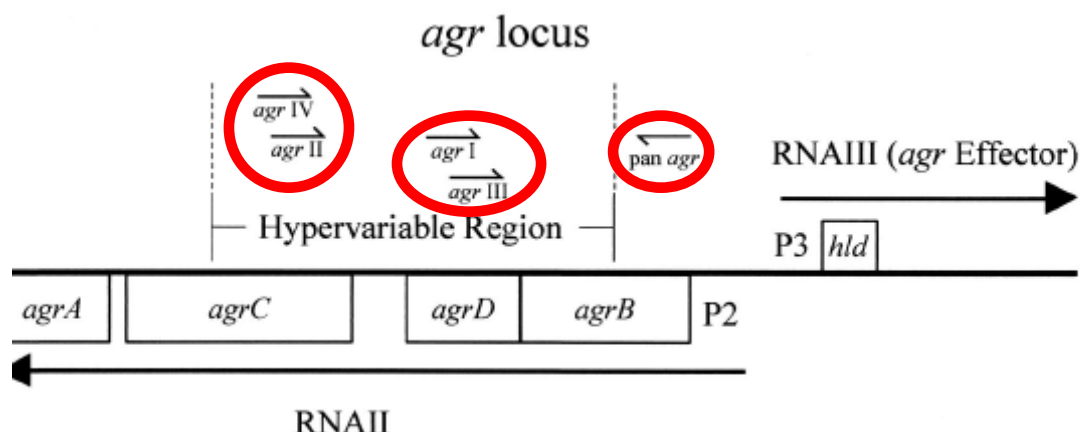


Figura 2: Região de anelamento dos *primers*
 Fonte: Shopsis et al., 2003.

2.4. Reação bplex-PCR

Adaptou-se a metodologia proposta por SHOPSIN et al. (2003). Preparou-se duas soluções: uma contendo 20 μM do conjunto de *primers* Pan, *agr* I e *agr* II, e outra contendo 20 μM do conjunto de *primers* Pan *agr* III e *agr* IV, em cada solução adicionou-se 5 μL do DNA extraído (10 a 20ng μL^{-1}), 2,5 μM de dNTP mix (Invitrogen®), 1U de *Taq* Polimerase (Invitrogen®), 50mM de MgCl_2 (Invitrogen®) e tampão 10 X para PCR (Invitrogen®), totalizando 25 μL por reação. As misturas foram submetidas a 95°C por 5 minutos para a desnaturação inicial do DNA e, posteriormente, termociclada por 30 ciclos, onde cada ciclo consistia de 1 minuto a 95°C, para a desnaturação do DNA, 1 minuto a 52°C, para a ligação dos *primers*, e 1 minuto a 72°C para extensão, seguida de uma extensão final de 3 minutos a 72°C. Para a determinação da temperatura de anelamento foi utilizada reação de PCR com gradiente de temperatura variando de 46°C a 60°C e, como houve amplificação em todas as faixas de temperatura, ficou estabelecida como temperatura ótima de anelamento a média dessa faixa, 52°C.

Utilizou-se como controles positivos em todas as reações, DNA das cepas padrão e controles negativos da reação. Todas as amostras de DNA foram submetidas à reação bplex-PCR, no mínimo, duas vezes, com extrações em dias diferentes.

2.5. Visualização e análise dos produtos amplificados

Imediatamente antes da aplicação no gel de agarose, os produtos de PCR foram descongelados e retirou-se uma alíquota de 5µL, à qual foram adicionados 2µL de tampão de carga e 3µL de corante Gel RED. Para a separação dos produtos amplificados foi realizada eletroforese (80V, 120 minutos) em gel de agarose 1,2% (p/v) em tampão TAE, pH 8,4 (Invitrogen® e Ludwig®). Concomitantemente com os produtos de PCR aplicou-se no gel um padrão de peso molecular (100 pb DNA Ladder e 1kb plus Invitrogen®). A visualização das bandas no gel e a fotodigitalização foram realizadas sob transiluminação com luz ultravioleta, sendo o tamanho dos fragmentos amplificados, determinado pelo software KDS 1D, através de comparação com o padrão de peso molecular.

2.6. Antibiograma

O perfil de resistência a antibióticos foi determinado pela técnica de difusão em disco, seguindo método recomendado pelo *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS), 2005. Os tamanhos dos halos de inibição, formados em Ágar Muller-Hinton (Acumedia®), foram comparados com os valores apresentados na tabela de interpretação do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2005), do NCLSI, e as cepas foram classificadas como resistentes, intermediárias ou sensíveis ao antibiótico analisado.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Prevalência de Grupos *agr*

Das 115 cepas testadas, 48 (41,7%) apresentaram padrão de banda compatível com um dos quatro grupos *agr*. Destas, 10 pertenciam ao grupo *agr I* (8,6%), 22 ao *agr II* (19,1%), 09 ao *agr III* (7,8%) e 07 ao *agr IV* (6,0%). Nas Figuras 3 e 4 demonstra-se o resultado da amplificação das cepas padrão de *S. aureus* pertencentes aos grupos *agr I*, *agr II*, *agr III* e *agr IV*

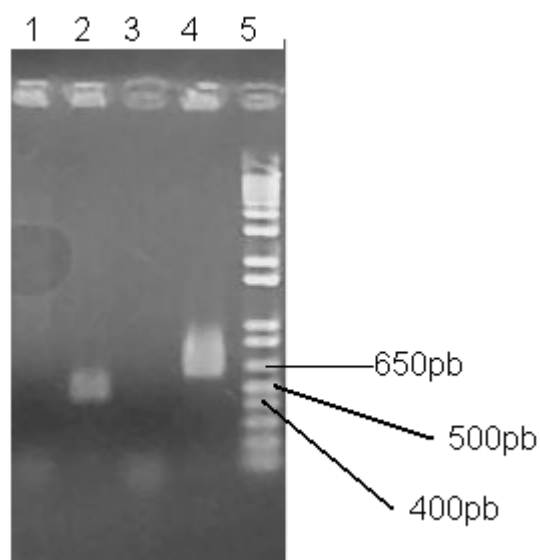


Figura 3: Eletroforese em gel de agarose 1,2%, de produtos de PCR realizada com DNA de *S. aureus* padrão para os grupos *agr I* e *agr II* – Coluna 1: controle negativo da reação Coluna 2: fragmento do grupo *agr I* (440pb) obtido a partir de DNA de *S. aureus* RN6390B; Coluna 3: Controle negativo com *primers*; Coluna 4: fragmento do grupo *agr II* (552pb) obtido a partir de DNA de *S. aureus* USA 100; Coluna 5:.. Marcador de massa molecular DNA *Ladder* 1kb plus (Invitrogen®).

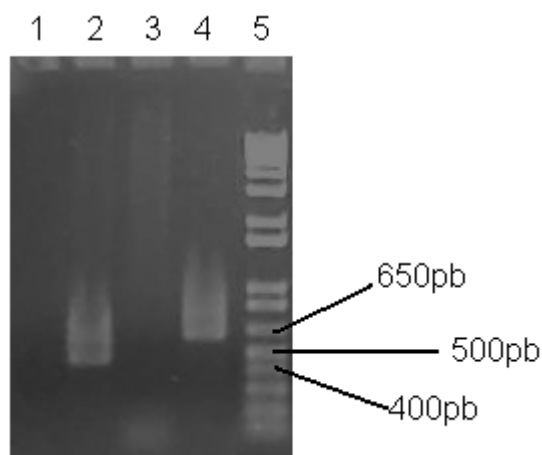


Figura 4: Eletroforese em gel de agarose 1,2%, de produtos de PCR realizada com DNA de *S. aureus* padrão para os grupos *agr* III e *agr* IV – Colunas 1: controle negativo da reação; Coluna 2: fragmento do grupo *agr* III (406pb) obtido a partir de DNA de *S. aureus* RN 8846; Coluna 3: Reação negativa com os *primers*; Coluna 4: fragmento do grupo *agr* IV (588pb) obtido a partir de DNA de *S. aureus* RN 4850; Coluna 5: Marcador de massa molecular DNA Ladder 1kb plus (Invitrogen®).

Nas 55 cepas isoladas de diversas fontes de alimentos, no sul do Rio Grande do Sul, a maior prevalência foi do grupo *agr* II, encontrado em 32,7% (18 cepas), seguido dos grupos *agr* III, com 9% (5), e *agr* I e *agr* IV com 5,4% (3) cada (tab.3).

Em cepas de *S. aureus* isoladas de carne de frango (38 cepas) houve maior prevalência do grupo *agr* II, com 36,8% (14) das cepas pertencendo a esse grupo. Entre as demais cepas, 7,9% (3) foram do grupo *agr* III, 5,3% (2) do grupo *agr* IV, e 2,6% (1) do grupo *agr* I.

Nas cepas oriundas de embutidos cárneos (11 cepas), também houve o predomínio do grupo *agr* II (27,2%), seguidos de *agr* I, II e IV com 9% cada. Da mesma forma, entre as duas cepas isoladas de charque, uma pertencia ao grupo *agr* II. Diferentemente dessa tendência, nas cepas oriundas de queijo Tipo Colônia (4 cepas), uma apresentou perfil de banda compatível com o grupo *agr* I e outra com o grupo *agr* III.

Tabela 3: Grupos *agr* em cepas de *S. aureus* provenientes de diferentes fontes de alimentos, isoladas no sul do Rio Grande do Sul

Origem das cepas	Número de cepas	Presença dos grupos <i>agr</i>				Total
		<i>agr</i> I	<i>agr</i> II	<i>agr</i> III	<i>agr</i> IV	
Carne de frango	38	1	14	3	2	20
Embutidos cárneos	11	1	3	1	1	06
Charque	2	0	1	0	0	01
Queijo Tipo Colônia	4	1	0	1	0	02

Nas cepas isoladas em Viçosa, MG (30 isoladas em leite de vacas mastíticas e 30 em queijo Tipo Minas Frescal), houve predomínio do grupo *agr* I, porém apenas em cepas isoladas em leite de vacas mastíticas. Nas cepas isoladas de leite de vacas mastíticas, seis pertenciam ao grupo *agr* I (20%), duas ao grupo *agr* II (6,7%), quatro ao grupo *agr* III (13,3%) e quatro ao grupo *agr* IV (13,3%). Das 30 cepas isoladas de queijo Tipo Minas Frescal, somente três apresentavam perfil de bandas compatível com algum dos grupos *agr*, sendo que duas cepas pertenciam ao grupo *agr* II e uma ao grupo *agr* I (tab.4).

Tabela 4: Grupos *agr* em cepas de *S. aureus* provenientes da região de Viçosa, MG

Origem das cepas	Número de cepas	Presença dos grupos <i>agr</i>				Total
		<i>agr</i> I	<i>agr</i> II	<i>agr</i> III	<i>agr</i> IV	
Leite de vacas com mastite	30	6	2	4	4	16
Queijo Tipo Minas Frescal	30	1	2	0	0	03

Resultados similares aos deste estudo foram encontrados por Buzzola et al (2007), na Argentina, que avaliaram 127 cepas de *S. aureus* isoladas de leite de vacas mastíticas, e também encontraram predomínio do grupo *agr* I (88%), seguido por *agr* II (8%), e *agr* III e IV, com 2% cada. Na análise por RFLP encontram um clone prevalente naquele país associado ao grupo *agr* I o que poderia, segundo os autores, indicar homogeneidade da população com ênfase na área geográfica, hospedeiro (vacas) e doença (mastite). Essas informações nos remetem a hipótese de relação entre grupo *agr* e origem das cepas, haja vista que em carne de frango e

embutidos cárneos houve maior prevalência do grupo *agr* II, enquanto que em leite, houve maior presença do *agr* I. A hipótese de relação com hospedeiro, neste caso origem, por relação clonal, foi verificada por Smith et al. (2005) em um estudo envolvendo *S. aureus* isolados de leite de vacas mastíticas analisados por MLST. Esses autores verificaram que havia, em cada clone, número selecionado de fatores de virulência e de ilhas de patogenicidade, o que conferiria especificidade ao hospedeiro ou a sua origem.

Diversos autores (Ayed et al, 2006; Goerke et al., 2002; Jarraud et al., 2002) apontam a associação de grupos *agr* a um clone específico ou grupos clonais. Nesse sentido, Vautor et al (2007), encontraram cepas pertencendo ao grupo *agr* III em 80% daquelas isoladas em leite de ovelhas com mastite no sul da França, e relataram a possibilidade de ligação entre origem genética e grupos *agr*. Essa mesma tendência foi demonstrada neste estudo, onde se observou maior prevalência de um determinado grupo *agr* dependendo da origem da cepa: entre as cepas isoladas de leite de vacas com mastite, provenientes de Viçosa, MG, houve prevalência do *agr* I (20%), e em cepas isoladas de produtos cárneos (carne de frango e embutidos), na região sul do Rio Grande do Sul, do grupo *agr* II.

Destaca-se, entretanto, que a simples presença de um dos quatro grupos *agr* em cepas de *S. aureus*, não significa similaridade genética, pois como verificaram Gilot and van Leeuwen (2004), avaliando cepas de *S. aureus* isoladas em humanos e em bovinos, em ambas houve prevalência do grupo *agr* I, porém, as populações eram distintas, pois apresentavam características genéticas únicas quando analisadas por RFLP. Os autores relatam que essas diferenças podem demonstrar a evolução genética da espécie indicando um nicho ou hospedeiro preferencial.

Esta dissimilaridade genética apontada por aqueles autores poderia ser uma das justificativas para as diferenças encontradas entre as cepas isoladas de queijo Tipo Minas Frescal e as isoladas de leite de vacas mastíticas, provenientes da região de Viçosa, MG (tab. 4), que embora tenham a mesma origem geográfica, houve baixa incidência de grupos *agr* entre as cepas isoladas em queijo, com leve predomínio do grupo *agr* II, enquanto que no leite percebemos predomínio do grupo *agr* I, demonstra. Outra hipótese seria somente, fonte de contaminação diferente, ou seja, hospedeiro preferencial diferente como: pessoas, objetos, animais, entre outras.

A observação de Melchior et al. (2009), que cepas *agr* I persistem em alto número nas células mamárias, internalizam *in vitro* células epiteliais mais facilmente que outros grupos *agr*, e são mais adaptadas, *in vitro*, a sobrevivência intracelular, o que justificaria o alto predomínio do grupo *agr* I entre as cepas de leite de vacas mastíticas, observado neste estudo (tab. 4).

Esses mesmos autores relatam que cepas *agr* II preferem um nicho extracelular e que, conseqüentemente, têm maior capacidade de formação de biofilme. Embora neste estudo não se tenha realizado uma correlação com produção de biofilmes, cepas isoladas de produtos cárneos (embutidos e carne de frango) que naturalmente passaram por um processamento na indústria, apresentaram uma prevalência do grupo *agr* II. Nesse mesmo sentido, Goerke et al (2003) descrevem que o polimorfismo do *locus agr* pode refletir a dinâmica de colonização de *S. aureus* em seu habitat, o que vem ao encontro do reportado neste estudo, onde a maioria das cepas isoladas de produtos cárneos pertenciam ao grupo *agr* II, que normalmente tem como fonte de contaminação manipulador e matéria-prima, diferente dos isolados de *S. aureus* isolados de leite de vacas mastíticas que apresentam como principal fonte de contaminação o úbere de vacas em lactação e pertenciam, na sua grande maioria, a outro grupo *agr*.

Traber et al. (2008), avaliando cepas de *S. aureus* envolvidas em diversas infecções, não encontraram correlação entre enfermidade e grupo *agr*, mas observaram que a maioria das cepas pertencia ao grupo *agr* I, assim como as cepas clínicas avaliadas neste trabalho.

É importante ressaltar que poucos autores caracterizaram os grupos *agr* em cepas de *S. aureus* isoladas em alimentos, sendo a grande maioria dos estudos realizados em cepas de *S. aureus* isoladas em leite de vacas com mastite ou com cepas clínicas de origem humana. Dessa forma, os resultados descritos neste estudo são relevantes e os primeiros relatados no Rio Grande do Sul.

2. Relação entre enterotoxinas e grupos *agr*

A literatura reporta que existe relação entre doenças causadas por estafilococos e determinado grupo *agr* (Jarraud et al., 2002; Chini et al., 2006; Collery et al., 2007). Dessa forma, procurou-se estabelecer uma relação entre a

presença de enterotoxinas e os grupos *agr*, dois fatores de virulência importantes em *S. aureus*.

Quatorze cepas, previamente caracterizadas quanto à presença de alguma enterotoxina, pertencentes ao Banco de Cepas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos da UFPel, foram selecionadas para se avaliar a relação entre a presença de enterotoxinas e determinado grupo *agr*. Entre as quatorze cepas, três carregavam o gene *eeb*, uma os genes *eea* e *eeb*, oito albergavam o *cluster egc* completo, e duas cepas apresentavam o gene *eed* e o *cluster egc*. A origem, número das cepas e os genes das enterotoxinas que cada cepa carregava podem ser observada na tab. 5.

Tabela 5: Origem, número de cepas e genes das enterotoxinas

Origem das cepas	Genes das enterotoxinas			
	<i>eea/eeb</i>	<i>eeb</i>	<i>eed/cluster egc</i>	<i>Cluster egc</i>
Carne de Frango	0	2	2	7
Embutidos Cárneos	1	1	0	1
Total	1	3	2	8

Observou-se que entre as 10 cepas que carregavam o *cluster egc* completo sete (70%) pertenciam ao grupo *agr* II, e as demais não pertenciam a grupos *agr*. Já entre as cepas que carregavam genes para as EE clássicas, não se observou relação com os grupos *agr*, sendo que somente duas cepas, uma pertencente ao grupo *agr* I e outra ao grupo *agr* IV, carregavam o gene da enterotoxina B (*eeb*).

Os resultados obtidos neste estudo estão em acordo com aqueles relatados por Jarraud et al (2002), que também observaram predomínio dos grupos *agr* II e I em doenças que envolvem a produção de enterotoxinas. Esses pesquisadores utilizaram AFLP, e identificaram três *clusters* principais: o primeiro agrupava cepas *agr* III, produtoras de TSST-1; o segundo englobava cepas *agr* I e II, envolvidas em doenças mediadas por enterotoxinas, sendo que este *cluster* agrupou todas as cepas que carregavam o *cluster egc*; e, no terceiro, cepas do grupo *agr* IV, produtoras de esfoliatina. Baseado nisso os autores relataram que há uma forte relação entre a presença de genes das toxinas e origem genética, concluindo que a patogenicidade específica da bactéria é associada a um clone específico ou a grupos clonais. Neste

estudo, não foi realizada análise filogenética, entretanto, a relação clonal reportada por aqueles autores nos reportam à possibilidade de haver uma relação clonal entre as cepas *agr II* portadoras do *cluster egc*.

Collery et al. (2008b) encontraram o *cluster egc* em 43 cepas isoladas de humanos e em 53 isoladas de animais e observaram que havia predominância do grupo *agr III*. Chini et al (2006) também delinearam um estudo para relacionar cepas carreadoras do *cluster egc* com os grupos *agr*. Para isso, avaliaram 177 cepas MRSA, sendo que 60 albergavam o *cluster egc*, e observaram que quatro carream o *cluster egc1* e pertenciam ao grupo *agr I* e uma, carregava o *cluster egc2* e pertencia ao grupo *agr III*, reforçando a hipótese de relação clonal. Essa tendência também foi verificada neste estudo, onde se observou alta relação entre cepas carregando o *cluster egc* e o grupo *agr II*, que foram isoladas na mesma matriz alimentar, no caso carne de frango.

Collery et al. (2008a) caracterizaram molecularmente *S. aureus* isolados em portadores nasais e demonstraram que 66,7% apresentavam genes para enterotoxinas clássicas (*eea*, *eeb* e *eec*), sendo *eeb* o gene prevalente. Além disso, encontraram uma alta prevalência do *cluster egc* (85,4%). O gene *tst* foi encontrado em menos de 15% das cepas. Quando avaliaram a presença dos diferentes grupos *agr*, encontraram 37,5% das cepas pertencentes ao *agr III*, 35,4% *agr II*, 25% *agr I* e 2,1% *agr IV*. Entretanto, não observaram relação entre perfil *agr* e produção de enterotoxina, mas entre os que apresentam o *cluster egc* completo, quatro cepas pertenciam ao grupo *agr I* e três a cada grupo *agr II* e *I*. Constataram, ainda que todos os isolados *tst* albergavam algum gene de enterotoxina clássica e pertenciam ao grupo *agr III*, o que neste estudo, não foi observado entre as enterotoxinas clássicas, já que somente duas pertenciam ao grupo *agr*, mesmo havendo trabalhos que indicam a regulação dessas enterotoxinas pelo *accessory gene regulator*.

Yoon et al. (2007) estudaram *S. aureus* isolados a partir de diferentes doenças clínicas e estabeleceram relação entre os grupos *agr I*, *II* e *III* e as doenças. Os pesquisadores descreveram 49,3% cepas MRSA isoladas de pacientes como pertencentes ao grupo *agr I*, 44% ao *agr II* e 6,7% ao grupo *agr III*, e relacionaram otites, ao grupo *agr I*. Resultados similares foram observados neste estudo, onde se demonstrou uma possível relação entre cepas *agr I* e a mastite, e a produção de enterotoxinas do *cluster egc* e grupo *agr II*.

3. Perfil de sensibilidade a antibióticos e relação com grupos *agr*

Foram utilizadas 30 cepas de *S. aureus* isoladas em leite de vacas mastíticas na região de Viçosa, MG, e 41 cepas provenientes de diversas fontes de alimentos, pertencentes ao Banco de Cepas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos do DCTA/FAEM/UFPel.

Observou-se que entre as cepas isoladas de leite de vacas com mastite, 100% apresentaram resistência à penicilina, ampicilina, cefoxitina e vancomicina. Os perfis demonstrados por essas cepas podem ser observados na tab. 6

Tabela 6: Perfil antimicrobiano de cepas de *S. aureus* isoladas em leite de vacas com mastite

Antibiótico	PERFIL		
	Resistente % (n)	Sensível % (n)	Intermediário % (n)
Ampicilina (AMP)	100% (30)	0	0
Cefalotina (CFL)	20% (6)	53,4% (16)	26,6% (8)
Cefoxitina (CFO)	100% (30)	0	0
Ciprofloxacina (CIP)	56,7% (17)	6,7% (2)	36,7% (11)
Clindamicina (CLI)	86,7% (26)	3,3% (1)	10% (3)
Cloranfenicol (CLO)	26,6% (8)	0	73,4% (22)
Eritromicina (ERI)	43,4% (13)	10% (3)	46,6% (14)
Gentamicina (GEN)	50% (15)	23,4% (7)	26,6% (8)
Oxacilina (OXA)	30% (9)	40% (12)	30% (9)
Penicilina (PEN)	100% (30)	0	0
Sulfazotrim (SUT)	6,7% (2)	60% (18)	33,3% (10)
Tetraciclina (TET)	46,7% (14)	13,3% (4)	40% (12)
Vancomicina (VAN)	100%	0	0

Em Portugal, Pereira et al. (2009), avaliando o perfil de resistência a antimicrobianos de *S. aureus* isolados de leite de vacas com mastite e de leite cru proveniente de vacas sadias, encontraram 70% dos isolados resistentes aos antibióticos penicilina e ampicilina, e nenhum isolado resistente a vancomicina. Esses autores relatam que essa resistência aos antibióticos β -lactâmicos deve-se ao tratamento para a mastite bovina com esses antimicrobianos e a capacidade de cepas de *S. aureus* de produzirem uma barreira de exopolissacarídeo, aumentando a parede celular e dificultando a ação destes antibióticos, o que poderia justificar o alto perfil de resistência apresentadas neste estudo.

Normanno et al. (2007) sugerem que os ruminantes podem atuar como reservatório de cepas MRSA, bem como de cepas oxacilina resistentes, e destacam a importância da caracterização molecular para entendermos a epidemiologia da transmissão de cepas oxacilina resistentes. Ressaltam, também, que a pasteurização do leite destrói o perigo direto de contaminação por cepas MRSA, mas em termos de segurança dos alimentos, a presença dessas cepas torna-se importante na contaminação cruzada, no consumo de leite cru e no processamento de derivados a partir do leite cru.

Peles et al. (2007) avaliaram leite de vacas com mastite, na Hungria, e encontraram alta resistência aos antibióticos β -lactâmicos, em especial à penicilina, o antibiótico de maior uso em casos de infecção da glândula mamária, resultados similares ao apresentado neste estudo, ressaltando a importância do caráter multiresistente dos antibióticos desse grupo.

No Brasil, Aires de Souza et al. (2007), encontraram 67% de sensibilidade em isolados de *S. aureus* isolados de leite de diferentes espécies, a todos os antimicrobianos testados (PEN, CEF, CFO, OXA, SUT, CLI, ERI, GEN e TET), diferindo dos apresentados nesse estudo.

Entre as cepas resistentes a oxacilina isoladas neste estudo, um dos principais β -lactâmicos utilizados na prática clínica, houve presença de cepas com perfil de bandas compatíveis com grupos *agr*. três cepas pertencem ao grupo *agr* I, uma ao grupo *agr* III e outra ao grupo *agr* IV. Entre cepas resistentes aos antibióticos ampicilina, cefoxitina, penicilina e vancomicina, observamos prevalência do grupo *agr* I.

Em estudo conduzido por Melchior et al. (2009), em cepas de *S. aureus* isoladas de mastite bovina, os autores relacionam o grupo *agr* I a cepas resistentes

a penicilina e a melhor adaptação à sobrevivência intracelular, o que influenciaria na eficiência da terapêutica e na propagação de cepas resistentes. Neste estudo, foram observados 100% resistência à penicilina, bem como se observou associação entre grupo *agr* I e esse antimicrobiano, resultados condizentes com os daqueles autores.

Ayed et al.(2006) avaliaram 57 cepas MRSA quanto a presença do *locus agr* e encontraram maior predomínio do grupo *agr* III (40,3%), seguido pelo grupo *agr* I (15,7%). Esses autores verificaram que cepas *agr* III estavam mais envolvidas em infecções não invasivas, enquanto cepas *agr* I, com doenças invasivas, como a mastite. Entre as cepas isoladas de leite de vacas com mastite neste estudo, houve predomínio do grupo *agr* I o mesmo encontrado em doenças invasivas por aqueles pesquisadores. Por outro lado, entre as cepas resistentes aos β -lactâmicos, grupo da meticilina, houve uma leve prevalência do grupo *agr* I, diferindo dos resultados daqueles pesquisadores. Os autores ainda relatam que a resistência a algum β -lactâmicos demonstra resistência a todos os demais β -lactâmicos, como observamos em nosso estudo, que encontramos resistência além à oxacilina, à ampicilina, à cefalotina, à cefoxitina, o que poderia indicar resistência à meticilina.

A associação entre *agr* I e gene de resistência a macrolídeos (*msrA*), como a eritromicina, envolvendo cepas MRSA- comunidade adquirida foi demonstrado por Bogdanovich et al (2007). No presente estudo, também foi possível realizar essa associação, haja vista o elevado índice de cepas isoladas em leite de vacas com mastite e resistentes a eritromicina, que pertenciam ao grupo *agr* I.

Entre as 41 cepas isoladas em diversas fontes de alimentos (30 de carne de frango, 8 de embutidos cárneos e 3 de queijo Tipo Colônia), também se encontrou 100% de resistência à penicilina, ampicilina, cefoxitina e vancomicina. O perfil de resistência aos demais antimicrobianos é descrito na tab. 7.

Tabela 7: Perfil de resistência a antibióticos de cepas de *S. aureus* isoladas em diversos alimentos, no sul do Rio Grande do Sul

Antibiótico	Resistente % (n)	Sensível % (n)	Intermediário % (n)
Ampicilina (AMP)	100% (41)	0	0
Cefalotina (CFL)	7,3% (3)	70,7% (29)	22% (9)
Cefoxitina (CFO)	100% (41)	0	0
Ciprofloxacina (CIP)	63,4% (26)	0	36,6% (15)
Clindamicina (CLI)	73,2% (30)	2,4% (1)	24,4% (10)
Cloranfenicol (CLO)	34,1% (14)	7,3% (3)	58,5% (24)
Eritromicina (ERI)	34,1% (14)	4,9% (2)	61% (25)
Gentamicina (GEN)	46,3% (19)	17% (7)	36,6% (15)
Oxacilina (OXA)	26,8% (11)	34,1% (14)	39,1% (16)
Penicilina (PEN)	100% (41)	0	0
Sulfazotrim (SUT)	0	87,8% (36)	12,2% (5)
Tetraciclina (TET)	61% (25)	9,7% (4)	29,2% (12)
Vancomicina (VAN)	100%	0	0

Observamos que entre a maioria das cepas isoladas de alimentos que foram resistentes a ampicilina, vancomicina, penicilina e cefoxitina houve prevalência do grupo *agr* II. Entre as cepas resistentes a oxacilina, duas pertenciam ao grupo *agr* II e carregavam os genes do *cluster egc*, e uma cepa pertencia ao grupo *agr* III. Nenhuma portava os genes das EE clássicas. Dentre os demais antibióticos não houve relação entre grupos *agr* e perfil de resistência a antimicrobianos.

Neste estudo verificou-se a presença de cepas multiresistentes sendo o perfil mais comum AMP/CEF/PEN/VAN diferindo de Kérouanton et al. (2007), que caracterizaram cepas de *S. aureus* isoladas de surtos de intoxicação alimentar na França, e demonstraram que das 33 cepas analisadas, apenas 11 apresentavam resistência a dois diferentes antimicrobianos, como a metilicina e a penicilina.

Já Peresi et al. (2006) avaliaram a susceptibilidade a antimicrobianos entre cepas de *S. aureus* isoladas em surtos de intoxicação estafilocócica ocorridos em São Paulo, e encontraram 32% das cepas sensíveis a todos os antibióticos testados, entretanto, 40% resistentes a dois antibióticos, sendo que os maiores níveis de resistência foram a penicilina, tetraciclina, oxacilina e cloranfenicol, com predomínio

da penicilina/oxacilina. Resultados similares foram obtidos neste estudo e, aliado aos dados obtidos por Peresi et al. (2006), demonstram a elevada ocorrência de cepas de *S. aureus* resistentes a antibióticos e/ou multiresistentes, contaminando alimentos, o que é preocupante em termos de saúde pública, tendo em vista a circulação dessa fonte nos mais diversos ambientes, inclusive o hospitalar.

Nema et al. (2007), estudaram cepas de *S. aureus* isoladas em surtos de intoxicação alimentar na Índia, e encontraram que todas foram sensíveis aos antibióticos testados (AMP, CFL, CLO, CLI, ERI, GEN, OXA e VAN) exceto à ampicilina. Os autores destacam que esse padrão é compatível com cepas provenientes de manipuladores de alimentos, em função da resistência à AMP, antibiótico usado indiscriminadamente na clínica humana sem prescrição médica. Os resultados deste estudo também demonstram resistência a antibióticos comumente usados na clínica médica sem prescrição, como AMP, PEN, GEN e TET, porém, também se observou resistência a antibióticos que necessitam ser prescritos por profissionais, como CFO, VAN e a CLI.

Nitzsche e Stephan (2007) avaliaram o perfil de resistência de *S. aureus* isolados de carcaças suínas, e verificaram alto grau de resistência aos antibióticos penicilina e ampicilina, resultado semelhante ao deste estudo, onde as cepas isoladas de carne de frango também apresentavam perfil de resistência à ampicilina e à penicilina. Ressalta-se que esses antibióticos são muito usados nos tratamentos de enfermidades de animais de criação, muitas vezes sem prescrição de um Médico Veterinário, aumentando a pressão de seleção e disseminando cepas de *S. aureus* resistentes entre animais, alimentos e, conseqüentemente, consumidores.

Pesavento et al. (2007), avaliaram o perfil de resistência de cepas de *S. aureus* isoladas em carne crua frente a 12 diferentes antibióticos (CFL, OXA, AM, TET, SUT ERI, CLI, GEN, PE, VAN, metilicina e teicoplan), e não encontraram cepas resistentes a vancomicina e metilicina. Entre os demais antibióticos testados, 30,95% das cepas foram resistentes a todos. Os autores atribuíram não terem encontrado cepas resistentes à vancomicina e metilicina, ao fato desses antibióticos serem de uso hospitalar. Entretanto, a resistência a determinados antibióticos antes somente observada em cepas isoladas em ambientes hospitalares, vem se disseminando inclusive com sua presença em alimentos como verificado neste estudo, onde 100% das cepas isoladas em diferentes fontes alimentares apresentavam resistência à vancomicina.

Alguns autores, como Pesavento et al. (2007), destacam que a avoporicina, um antibiótico usado como promotor de crescimento em frangos seja a grande causa do aumento da resistência a oxacilina em cepas de microrganismos isolados nesse tipo de alimento. Neste estudo, se observou um elevado percentual de resistência à oxacilina entre as cepas isoladas de carne de frango, mas não se pode relacionar ao uso de promotores de crescimento de frangos como causa dessa resistência, haja vista que esta prática é proibida no Brasil.

André et al. (2008), avaliaram cepas de *S. aureus* isoladas de manipuladores de alimentos, leite cru e queijo Tipo Minas Frescal, no Brasil, e encontraram 100% de sensibilidade à vancomicina, gentamicina e ciprofloxacina. Resultados divergentes foram encontrados neste estudo, destacando-se a vancomicina com 100% de resistência, sendo um antibiótico de segunda escolha na clínica contra *S. aureus*. Os antibióticos que apresentaram maior percentagem de resistência foram a penicilina, oxacilina, tetraciclina e eritromicina, com 69,9%, 5,5%, 24,7% e 5,5%, respectivamente, os mais usados no tratamento de vacas com mastite. Os autores destacam que esses resultados demonstram a necessidade de maiores investigações epidemiológicas sobre as formas de transferência de resistência a antibióticos na cadeia de produção de alimentos.

Reinoso et al. (2008), na Argentina, avaliaram o perfil de resistência de cepas de *S. aureus* provenientes de diversas fontes de alimentos e encontraram que 100% foram sensíveis a todos os antibióticos testados (CFL, ERI, PEN, TET, kanamicina, novobiocina e estreptomicina), o que difere dos nossos resultados, já que nenhuma cepa apresentou 100% sensibilidade aos antibióticos testados. Aqueles autores também estudaram cepas isoladas de leite de vacas com mastite, onde 27% apresentaram resistência à penicilina, corroborando com dados encontrados neste estudo. Os autores indicam a transferência horizontal de genes e o uso indiscriminado de antibióticos em humanos, como causa do elevado percentual de resistência das cepas, o que poderia justificar o elevado número de isolados resistentes apresentados nesse estudo.

Simeoni et al. (2008) avaliaram, por PCR, o perfil de resistência de cepas de *Staphylococcus* spp. isoladas de alimentos, e encontraram a presença de 4 genes de resistência (tetraciclina (*tet*), eritromicina (*eri*), β -lactâmico (*blaZ*) e a oxacilina resistência (*mecA*)) em 72,7% das cepas, confirmando a expansão de bactérias multiresistentes na cadeia de produção de alimentos. Embora neste estudo não se

tenha utilizado técnicas moleculares para a identificação de genes envolvidos em resistência a antibióticos, os resultados fenotípicos condizem com os encontrados por aquele autor, reiterando a importância do monitoramento do perfil de resistência de cepas isoladas em alimentos e no ambiente de processamento de alimentos.

Laplana et al. (2007), tipificando isolados clínicos de *S. aureus* encontraram, no mesmo perfil determinado por PFGE, cepas MRSA e MSSA o que sugere, segundo os autores, transferência genética do gene *mecA* para cepas MSSA ou deleção desse mesmo gene em MSSA, o que poderia justificar as diferenças de resistência/sensibilidade ao oxacilina entre cepas avaliadas neste estudo.

Sakoulas et al. (2002) e Moise-Broder et al. (2004) verificaram associação entre cepas de *S. aureus* com sensibilidade intermediária aos glicopeptídeos (GISA) e falha na terapia com vancomicina em cepas MRSA, com grupo *agr* II. Neste estudo observamos alta prevalência de cepas *agr* II entre as cepas isoladas de diversas fontes de alimento, o que poderia explicar a elevada resistência aos glicopeptídeos encontrado entre eles.

CONCLUSÕES

A técnica de bplex PCR padronizada permitiu identificar os quatro grupos *agr* em cepas padrão de *S. aureus* e em cepas isoladas de alimentos e leite de vacas mastíticas, demonstrando uma alta prevalência do grupo *agr* II entre as cepas testadas.

Nas cepas isoladas de diversas fontes de alimentos houve prevalência do grupo *agr* II, seguido dos grupos *agr* III, *agr* I e *agr* IV. Avaliando-se cada alimento separadamente (carne de frango, embutidos cárneos e queijo Tipo Colônia) também houve predomínio do grupo *agr* II.

Em cepas provenientes de leite de vacas mastíticas, isoladas em Viçosa, MG, houve predomínio do grupo *agr* I.

Houve relação entre cepas que carregavam o *cluster egc* completo e grupo *agr* II, com grande maioria dessas cepas pertencendo a esse grupo. Entretanto, nenhuma relação foi observada entre cepas que albergavam genes das EE clássicas e os grupos *agr*.

Todas as cepas apresentaram multiresistência, tanto entre as isoladas de leite de vacas mastíticas quanto nas isoladas de alimentos.

Nas cepas isoladas de alimentos, que eram resistentes a ampicilina, vancomicina, penicilina e cefoxitina, observou-se prevalência do grupo *agr* II, entretanto, nas cepas provenientes de leite de vacas com mastite nenhuma relação entre grupo *agr* e resistência a antibiótico foi observada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIRES-DE-SOUSA, M.; PARENTE, C.; VIEIRA-DA-MOTTA, O.; BONNA, I.; SILVA, D.; LENCASTRE, H. Characterization of *Staphylococcus aureus* Isolates from Buffalo, Bovine, Ovine, and Caprine Milk Samples Collected in Rio de Janeiro State, Brazil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n.12, p. 3845-3849, 2007.

ALTERTHUM, F. Mecanismos de Ação dos Antibacterianos e Mecanismos de Resistência. In: TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5 ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2008. p. 79-92.

ANDRÉ, M. C. D. P. B.; CAMPOS, M. R. H.; BORGES, L. J.; KIPNIS, A.; PIMENTA, F. C.; SERAFINI, A. B. Comparison of *Staphylococcus aureus* isolates from food handlers, raw bovine milk and Minas Frescal cheese by antibiogram and pulsed-field gel electrophoresis following *Sma*I digestion. **Food Control**, v. 19, p. 200–207, 2008.

APPELBAUM, P. C. Microbiology of Antibiotic Resistance in *Staphylococcus aureus*. **Clinical Infectious Diseases**, v. 45, p. 165–170, 2007.

ARVIDSON, S.; TEGMARK, K. Regulation of virulence determinants in *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Medicine Microbiology**, v. 291, p. 159-170, 2001.

AYED S., BOUTIBA-BEN BOUBAKER I.; SAMIR E., BEN REDJEB S. Prevalence of *agr* specificity groups among methicilin resistant *Staphylococcus aureus* circulating at Charles Nicolle hospital of Tunis. **Pathologie Biologie** v.54, p.435–438, 2006.

BALABAN, N.; NOVICK, R. P. Autocrine regulation of toxin synthesis by *Staphylococcus aureus*. **Proc. Natl. Acad. Sci**, v. 92, p. 1619-1623, 1995.

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

BEENKEN, K. E.; DUNMAN, P. M.; MCALEESE, F.; MACAPAGAL, D.; MURPHY, E.; PROJAN, S. J.; BLEVINS, J. S.; SMELTZER, M. S. Global Gene Expression in *Staphylococcus aureus* Biofilms. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 14, p. 4665–4684, 2004.

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

BLAIOTTA, G.; FUSCO, V.; EIFF, C.; VILLANI, F.; BECKER, K. Biotyping of Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* by enterotoxin gene cluster (*egc*) polymorphism and *spa* typing analyses. **Applied in Environmental Microbiology**, vol. 72, n. 9, p. 6117-6123, 2006.

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

BOGDANOVICH, T.; AYDIN, N.; CHAVEZ-BUENO, S.; GEORGE MCCracken, G.; BOZDOGAN, B.; APPELBAUM, P. C. Genetic characterization of erythromycin- and methicillin-resistant community-acquired *Staphylococcus aureus* isolated from children in Texas. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, p. 1-3, 2007.

BOLES, B. R.; HORSWILL, A. R. *agr*-Mediated Dispersal of *Staphylococcus aureus* Biofilms. **PLoS Pathogens**, v. 4, n. 4, p. 1-13, 2008.

BOYNUKARA, B.; GULHAN, T.; ALISARLI, M.; GURTURK, K.; SOLMAZ, H. Classical enterotoxigenic characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine subclinical mastitis in Van, Turkey. **International Journal of Food Microbiology**, v. 125, p. 209–211, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC no 12, de 02 de janeiro de 2001. **Aprova regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos**. Brasília, DF, 10 jan. 2001b. Capturado em 06 jun 2007. Online. Disponível na Internet <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12-01rda.htm>.

BRONNER, S.; MONTEIL, H.; PRÉVOST, G. Regulation of virulence determinants in *Staphylococcus aureus*: complexity and applications. **Microbiology Reviews**, v. 28, p. 183–200, 2004.

BUZZOLA, F. R.; ALVAREZ, L. P.; TUCHSCHERR, L. P. N.; BARBAGELATA, M. S.; LATTAR, S. M. L.; LUIS CALVINHO, L.; SORDELLI, D. N. Differential Abilities of Capsulated and Noncapsulated *Staphylococcus aureus* Isolates from Diverse *agr* Groups To Invade Mammary Epithelial Cells. **Infection and Immunity**, v. 57, n. 2, p. 886–891, 2007.

CAFISO, V.; BERTUCCIO, T.; SANTAGATI, M.; DEMELIO, V.; SPINA, D.; NICOLETTI, G.; STEFANI, S. *agr* -Genotyping and transcriptional analysis of biofilm-producing *Staphylococcus aureus*. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v.51, p. 220–227, 2007.

CARDOSO, J. L.; CASTANHEIRA, M.; OLIVEIRA, R. M.; SILVA, S. A.; PIGNATARI, A. C. C.; MENDES, R. E.; PIMENTA, F. C.; ANDRADE, A. L. S. S. Carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in children in Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 57, p.467–470, 2007.

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

CHEUNG, A. L.; BAYER, A. S.; ZHANG, G.; GRESHAM, H.; XIONG Y. Regulation of virulence determinants in vitro and in vivo in *Staphylococcus aureus*. **Immunology and Medical Microbiology**, v. 40, p. 1-9, 2004.

CHIANG, Y. C.; LIAO, W. W.; FAN, C. M.; PAI, W. Y.; CHIOU, C. S.; TSEN, H. Y. PCR detection of Staphylococcal enterotoxins (SEs) N, O, P, Q, R, U, and survey of SE types in *Staphylococcus aureus* isolates from food-poisoning cases in Taiwan. **International Journal of Food Microbiology**, v. 12, p. 66–73, 2008.

CHINI, V.; DIMITRACOPOULOS, G.; SPILIOPOULOU, I. Occurrence of the Enterotoxin Gene Cluster and the Toxic Shock Syndrome Toxin 1 Gene among Clinical Isolates of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Is Related to Clonal Type and *agr* Group **Journal Of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 5, p. 1881–1883, 2006.

CHOPRA, I.; ROBERTS, M. Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. **MICROBIOLOGY AND Molecular Biology Reviews**, v. 65, n. 2, p. 232–260, 2001.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI), 2005. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard — Sixth Edition (M7-A6). **Clinical and Laboratory Standards Institute**, Wayne, PA.

COLLERY, M. M.; SMYTH, D. S.; TUMILTY, J. J. G.; TWOHIG, J. M.; SMYTH, C. J. Associations between enterotoxin gene cluster types *egc1*, *egc2* and *egc3*, *agr* types, enterotoxin and enterotoxin-like gene profiles, and molecular typing characteristics of human nasal carriage and animal isolates of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 58, p. 13-25, 2009.

COLLERY, M. M.; SMYTH, D. S.; TWOHIG, J. M.; SHORE, A. C.; COLEMAN, D. C.; SMYTH, C. J. Molecular typing of nasal carriage isolates of *Staphylococcus aureus* from an Irish university student population based on toxin gene PCR, *agr* locus types

and multiple locus, variable number tandem repeat analysis. **Journal of Medical Microbiology**, v. 57, p. 348-358, 2008.

CONTER, M.; PALUDI, D.; ZANARDI, E.; GHIDINI, S.; VERGARA, A.; IANIERI, A. Characterization of antimicrobial resistance of foodborne *Listeria monocytogenes*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 128, p. 497–500, 2009.

COUZINET, S.; JAY, C.; BARRAS, C.; VACHON R.; VERNET, G.; NINET B.; JAN I.; MINAZIO M.; FRANCOIS P.; LEW D.; TROESCH, A.; SCHRENZEL, J. High-density DNA probe arrays for identification of staphylococci to the species level. **Journal of Microbiological Methods**, n.6, p. 201– 208, 2005.

DEURENBERG, R. & STOBBERINGH, E. The evolution of *Staphylococcus aureus*. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 8, p. 747-763, 2008.

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

EUZÉBY, J. P. List of Bacterial names with Standing in Nomenclature. Disponível em: <http://www.bacterio.cict.fr/s/staphylococcus.html>. Acesso em: 19 out. 2009.

FAGUNDES, H. Ocorrência de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* O157: H7 em rebanhos leiteiros do Estado de São Paulo. 2007. **Tese (Doutorado em Zootecnia)** - Faculdade de Zootécnica e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, São Paulo.

FISCHER, A.; FRANCOIS, P.; HOLTFRETER, S.; BROEKER, B.; SCHRENZEL, J. Development and evaluation of a rapid strategy to determine enterotoxin gene content in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Microbiological Methods**, 2009.

FLUIT, A. C.; VISSER, M. R.; SCHMITZ, F. J. Molecular Detection of Antimicrobial Resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 4, p. 836–871, 2001.

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

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

GASKILL, M. E.; KHAN, S. A. Regulation of the Enterotoxin B Gene in *Staphylococcus aureus*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 263, n. 13, p. 6276-6280, 1988.

GILLASPY, A. F.; HICKMON, S. G.; SKINNER, R. A.; THOMAS, J. R.; NELSON, C. L.; SMELTZER, M. S. Role of the Accessory Gene Regulator (*agr*) in Pathogenesis of Staphylococcal Osteomyelitis. **Infection and Immunity**, v. 63, n. 9, p. 3373–3380, 1995.

GILOT, P. E VAN LEEUWEN, W. Comparative Analysis of *agr* Locus Diversification and Overall Genetic Variability among Bovine and Human *Staphylococcus aureus* Isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 3, p. 1265–1269, 2004.

GILOT, P.; LINA, G.; COCHARD, T.; POUTREL, B. Analysis of the Genetic Variability of Genes Encoding the RNA III-Activating Components Agr and TRAP in a Population of *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Cows with Mastitis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 11, p. 4060–4067, 2002.

GOERKE, C.; ESSER, S.; KÜMMEL, M; WOLZ, C. *Staphylococcus aureus* strain designation by *agr* and *cap* polymorphism typing and delineation of *agr* diversification by sequence analysis. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 295, p. 67–75, 2005.

GOERKE, C.; KÜMMEL, M.; DIETZ, K.; WOLZ, C. Evaluation of Intraspecies Interference Due to *agr* Polymorphism in *Staphylococcus aureus* during Infection and Colonization. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 188, p. 250-256, 2003.

GOERKE, C.; WOLZ, C. Regulatory and genomic plasticity of *Staphylococcus aureus* during persistent colonization and infection. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 294, p. 195–202, 2004.

GORDON, R. J.; LOWY, F. D. Pathogenesis of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infection. **Clinical Infectious Disease**, v. 46, p. 350–359, 2008.

GOULD, I. M. MRSA bacteraemia. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 30, p. 66-70, 2007.

GOV, Y.; BITLER, A.; DELL'ACQUA, G. ; TORRES, J. V.; BALABAN, N. RNAIII inhibiting peptide (RIP), a global inhibitor of *Staphylococcus aureus* pathogenesis: structure and function analysis. **Peptides**, v. 22, p. 1609–1620, 2001.

HIRAMATSU, K. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*: a new model of antibiotic resistance. **Lancet Infectious Diseases**, v. 1, p. 147–155, 2001.

INGAVALLE, S.; WILLEM W.; LUONG, T.; LEE, C.; CHEUNG, A. Rat/MgrA, a Regulator of Autolysis, Is a Regulator of Virulence Genes in *Staphylococcus aureus* **Infection and Immunity**, v. 73, n. 3, p. 1423–1431, 2005.

JARRAUD, S.; MOUGEL, C.; THIOULOUSE, J.; LINA, G.; MEUGNIER, H.; FOREY, F.; NESME, X.; ETIENNE, J.; VANDENESCH, J. Relationships between *Staphylococcus aureus* Genetic Background Virulence Factors, agr Groups (Alleles), and Human Disease. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 2, p. 631-641, 2002.

JARRAUD, S.; LYON, G.; FIGUEIREDO, A. M. S.; GERARD, L.; VANDENESCH, F.; ETIENNE, J.; MUIR, T. W.; NOVICK, R. P. Exfoliatin-Producing Strains Define a Fourth agr Specificity Group in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 22, p. 6517–6522, 2000.

JI, G.; BEAVIST, R. C.; NOVICK, R. P. N. Bacterial Interference Caused by Autoinducing Peptide Variants. **Science**, v. 276, 1997

JI, G.; BEAVIST, R. C.; NOVICK, R. P. N. Cell density control of staphylococcal virulence mediated by an octapeptide pheromone. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 92, p. 12055-12059, 1995.

JONES, T. F.; KELLUM, M. E.; PORTER, S. S.; BELL, M.; SCHAFFNER, W. An Outbreak of Community-Acquired Foodborne Illness Caused by Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 1, p. 82-84, 2002.

JORGENSEN, H. J.; MATHISEN, T.; LOVSETH, A.; OMOE, K.; QVALE, K. S.; LONCAREVIC, S. An outbreak of staphylococcal food poisoning caused by enterotoxin H in mashed potato made with raw milk. **FEMS Microbiology Letters**, v.252, p. 267–272, 2005.

KATSUDA K.; HATA E.; KOBAYASHI, H.; KOHMOTO M.; KAWASHIMA, K.; TSUNEMITSU H.; EGUCHI, M. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitic milk on the basis of toxin genes and coagulase gene polymorphisms. **Veterinary Microbiology**, v.105, p. 301–305, 2005.

KÉROUANTON, A.; HENNEKINNE, J. A.; LETERTRE, C.; PETIT, L.; CHESNEAU, O.; BRISABOIS, A.; DE BUYSER, M. L. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains associated with food poisoning outbreaks in France. **International Journal of Food Microbiology**, v. 115, p. 369–375, 2007.

KLUYTMANS, J.; VAN LEEUWEN, W.; GOESSENS, W.; HOLLIS, R.; MESSER, S.; HERWALDT, L.; BRUINING, H.; HECK, M.; JULES ROST, J.; VAN LEEUWEN, N.;

VAN BELKUM, A.; VERBRUGH, H. Food-Initiated Outbreak of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Analyzed by Pheno- and Genotyping. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 5, p. 1121–1128, 1995.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN JR., W. C. **Diagnóstico Microbiológico**. Medsi Editora Médica e Científica Ltda., 2001. 1466p.

KOREEN, L.; RAMASWAMY S. V.; GRAVISS, E. A.; NAIDICH, S.; MUSSER, J. M.; KREISWIRTH, B. N. *spa* Typing Method for Discriminating among *Staphylococcus aureus* Isolates: Implications for Use of a Single Marker To Detect Genetic Micro- and Macrovariation. **Journal Of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 2p. 792–799, 2004.

KOREM, M.; SHEORAN, A. S.; GOV, Y.; TZIPORI, S.; BOROVIK, I.; BALABAN, N. Characterization of RAP, a quorum sensing activator of *Staphylococcus aureus*. **Microbiology Letters**, v. 223, p. 167-175, 2003.

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

LAPLANA, L. M.; CEPERO, M. P. G.; RUIZ, J.; ZOLEZZI, P. C.; CALVO, M. C. R.; ERAZO, M. C.; GÓMEZ-LUS, R. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* clinical isolates by pulsed-field gel electrophoresis, staphylococcal cassette chromosome *mec* type determination and dissemination of antibiotic resistance genes. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 30, p. 505–513, 2007.

LI, Y.; ZHU, X.; HUANG, Y.; XIONG, H. Mutational analysis of the binding of staphylococcal enterotoxin D to the T cell receptor V_α chain and major histocompatibility complex class II. **Immunology Letters**, v. 105, p. 55–60, 2006.

LIVERMORE, D. M. Antibiotic resistance in staphylococci. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.16, p. 3–10, 2000.

LOIR, Y. L.; BARON, F.; GAUTIER, M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. **Genet. Mol. Res.** v. 2, p. 63-76, 2003.

LUONG, T.; DUNMAN, P. M.; MURPHY, E.; PROJAN, S. J.; Y. LEE, C. Y. Transcription Profiling of the *mgrA* Regulon in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**, v. 188, n. 05, p. 1899–1910, 2006.

LYON, G. J.; NOVICK, R. P. Peptide signaling in *Staphylococcus aureus* and other Gram-positive bacteria. **Peptides**, v. 25, p. 1389–1403, 2004.

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

MCCULLOCH, J. A. Avaliação da funcionalidade do locus “accessory gene regulador” *agr* em cepas *Staphylococcus aureus* brasileiras com suscetibilidade reduzida aos glicopeptídeos. 2006. **Tese (Doutorado em Análises Clínicas)** - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

MELCHIOR, M. B.; VAN OSCH, M. H. J.; GRAAT, R. M.; VAN DUIJKEREN, E.; MEVIUS, D. J.; NIELEN, M.; GAASTRA, W.; FINK-GREMMELS, J. Biofilm formation and genotyping of *Staphylococcus aureus* bovine mastitis isolates: Evidence for lack of penicillin-resistance in Agr-type II strains. **Veterinary Microbiology**, v. 137, p. 83–89, 2009.

MOISE-BRODER, P. A.; SAKOULAS, G.; ELIOPOULOS, G. M.; SCHENTAG, J. J.; FORREST, A.; MOELLERING, R. C. JR. Accessory Gene Regulator Group II Polymorphism in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Is Predictive of Failure of Vancomycin Therapy. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, p. 1700–1705, 2004.

MULLARKY, L. K.; FRIEZE, C.; PARK, Y. H ; SORDILLO, L. M. *Staphylococcus aureus agr* Genotypes with Enterotoxin Production Capabilities Can Resist Neutrophil Bactericidal Activity. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 1, p. 45–51, 2001.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARD. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility testing. Pennsylvania, 2005. (NCCLS document M2-A8 and supplemental tables M100-S15).

NAWAZ, M. S.; KHAN, S. A.; KHAN, A. A.; KHAMBATY, F. M.; CERNIGLIA, C. E. Comparative molecular analysis of erythromycin-resistance determinants in staphylococcal isolates of poultry and human origin. **Molecular and Cellular Probes**, v. 14, p. 311–319, 2000.

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

NITZSCHE, S.; ZWEIFEL, C.; STEPHAN, R. Phenotypic and genotypic traits of *Staphylococcus aureus* strains isolated from pig carcasses. **Veterinary Microbiology**, v. 120, p. 292–299, 2007.

NORMANNO, G.; CORRENTE, M.; SALANDRA, G.; DAMBROSIO, A.; QUAGLIA, N. C.; PARISI, A.; GRECO, G.; BELLACICCO, A. L.; VIRGILIO, S.; CELANO, G. V. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in foods of animal origin product in Italy. **International Journal of Food Microbiology**, v. 117, p. 219–222, 2007.

Nosocomial Infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 4, p. 1427–1435, 2002.

NOVICK, R. P.; GEISINGER, E. Quorum Sensing in Staphylococci. **Annu. Rev. Genet.**, v. 42, p. 541-564, 2008.

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

OTTO, M. *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* peptide pheromones produced by the accessory gene regulator *agr* system. **Peptides**, v. 22, p. 1603–1608, 2001.

PAPAKYRIACOU, H.; VAZ, D.; SIMOR, A.; LOUIE, M.; MCGAVIN, M. J. Molecular Analysis of the Accessory Gene Regulator (*agr*) Locus and Balance of Virulence Factor Expression in Epidemic Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 181, p. 990–1000, 2000.

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

PÉPIN M.; DELLAMONICA P. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates recovered from dairy sheep farms (*agr* group, adherence, slime, resistance to antibiotics). **Small Ruminant Research**, v.72, p. 197–199, 2007.

PEREIRA, V.; LOPES, C.; CASTRO, A.; SILVA, J.; GIBBS, P.; TEIXEIRA, P. Characterization for enterotoxin production, virulence factors, and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from various foods in Portugal. **Food Microbiology**, p. 1–5, 2009.

PERESI, J. T. M.; ALMEIDA, I. A. Z. C.; CARDIGA, E. A. MARQUES, D. F.; CARNICEL, F. A.; HOFFMANN, F. F. Susceptibilidade antimicrobiana de cepas de *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* spp. isoladas de alimentos envolvidos em

surtos de doenças bacterianas transmitidas por alimentos, ocorridos na região noroeste do Estado de São Paulo, no período de abril de 1990 a dezembro de 2003. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 65, n. 2, p. 112-117, 2006.

PESAVENTO, G.; DUCCI, B.; COMODO, N.; LO NOSTRO, A. Antimicrobial resistance profile of *Staphylococcus aureus* isolated from raw meat: A research for methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Food Control**, v. 18, p. 196–200, 2007.

Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. **Veterinary Microbiology**, v. 92, p. 179–185, 2003.

QAZI, S. N. A.; COUNIL, E.; MORRISSEY, J.; REES, C.; COCKAYNE, A.; WINZER, K.; CHAN, W.; WILLIAMS, P.; HIL, P. J. *agr* Expression Precedes Escape of Internalized *Staphylococcus aureus* from the Host Endosome. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 11, p. 7074–7082, 2001.

REGASSA, L. B.; BETLEY, M. J. Alkaline pH Decreases Expression of the Accessory Gene Regulator (*agr*) in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**, v. 174, n. 15, p. 5095-5100, 1992.

REINOSO, E. B.; EL-SAYED, A.; LÄMMLER, C. ; BOGNI, C.; ZSCHÖCK, M. Genotyping of *Staphylococcus aureus* isolated from humans, bovine subclinical mastitis and food samples in Argentina. **Microbiological Research**, v. 163, p. 314-322, 2008.

RIBEIRO, A.; CORONADO, A. Z.; SILVA-CARVALHO, M. C.; FERREIRA-CARVALHO, B. T.; DIAS, C.; ROZENBAUM, R. Detection and characterization of international community-acquired infections by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Rio de Janeiro and Porto Alegre cities causing both community- and hospital-associated diseases. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 59, p. 339-345, 2007.

SAKAI, H.; PROCOP, G. W.; KOBAYASHI, N.; TOGAWA, D.; WILSON, A.; BORDEN, L.; KREBS, V.; BAUEN, T. W. Simultaneous Detection of *Staphylococcus aureus* and Coagulase-Negative Staphylococci in Positive Blood Cultures by Real-Time PCR with Two Fluorescence Resonance Energy Transfer Probe Sets. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 12, p. 5739–5744, 2004.

SAKOULAS, G. The accessory gene regulator (*agr*) in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Role in virulence and reduced susceptibility to glycopeptides antibiotics. **Infectious diseases**, v. 3, n. 2, p. 287-294, 2006.

SAKOULAS, G.; ELIOPOULOS, G. M.; MOELLERING, JR. R. C.; NOVICK, R. P.; VENKATARAMAN, L.; WENNERSTEN, C.; DEGIROLAMI, P. C.; SCHWABER, M. J.; GOLD, H. S. *Staphylococcus aureus* Accessory Gene Regulator (*agr*) Group II: Is There a Relationship to the Development of Intermediate-Level Glycopeptide Resistance? **The Journal of Infectious Diseases**, v. 187, p. 929–38, 2003.

SANTOS, A. L.; SANTOS, D. O.; FREITAS, C. C.; BRUNO LEAL ALVES FERREIRA, B. L. A. F.; AFONSO, I. F.; RODRIGUES, C. R. R.; CASTRO, H. C. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **J Bras Patol Med Lab**, v. 43, n. 6, p. 413-423, 2007.

SHERL, A.; FRANÇOIS, P.; BENTO, M.; DESHUSSES, J. et al. Correlation of proteomic and transcription profiles of *Staphylococcus aureus* during the post exponential phase of growth. **Journal of Microbiological Methods**, v. 60, p. 247-257, 2005.

SHOPSIN, B. et al. Prevalence of *agr* Specificity Groups among *Staphylococcus aureus* Strains Colonizing Children and Their Guardians. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, p. 456-459, 2003.

SILVA, W. P. Caracterização fenotípica e genotípica de cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas de leite de vacas com mastite subclínica e de outras fontes em propriedades produtoras de leite. 1998. **Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos)** - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

SIMEONI, D.; RIZZOTTI, L.; COCCONCELLI, P.; GAZZOLA, S.; DELLAGLIO, F.; TORRIANI, S. Antibiotic resistance genes and identification of staphylococci collected from the production chain of swine meat commodities. **Food Microbiology**, v. 25, p. 196–201, 2008.

SMITH, E. M.; GREEN, L. E.; MEDLEY, G. F.; BIRD, H. E.; FOX, L. K.; SCHUKKEN, Y. H.; KRUIZE, J. V.; BRADLEY, A. J.; ZADOKS, R. N.; DOWSON, C. G. Multilocus Sequence Typing of Intercontinental Bovine *Staphylococcus aureus* Isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 9, p. 4737–4743, 2005.

SMYTH, D.; HARTIGAN, P.; MEANEY, W.; FITZGERALD, J.R.; DEOBALD, C.; BOHACH G; SMYTH C. Superantigen genes encoded by the *egc* cluster and SaPIbov are predominant among *Staphylococcus aureus* isolates from cows, goats, sheep, rabbits and poultry. **Journal of Medical Microbiology**, v.54, p.401–411, 2005.

SOLA, C.; GRIBAUDO, G.; CÓRDOBA MRSA COLLABORATIVE STUDY GROUP, VINDEL, A.; PATRITO, L.; BOCCO, J. L. Identification of a Novel Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Epidemic Clone in Córdoba, Argentina, Involved in Nosocomial Infections. **Journal Of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 4, p. 1427–1435, 2002.

SRINIVASAN, A.; DICK, J. D.; PERL, T. M. Vancomycin Resistance in *Staphylococci*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, n. 3, p. 430–438, 2002.

STER, C.; GILBERT, F. B.; COCHARD, T.; POUTREL, B. Transcriptional profiles of regulatory and virulence factors of *Staphylococcus aureus* of bovine origin: oxygen impact and strain-to-strain variations. **Molecular and Cellular Probes**, v. 19, p. 227–235, 2005.

STEWART, C. D.; RANEY, P. M.; MORRELL, A. K.; WILLIAMS, P. P.; MCDOUGAL, L. K.; JEVITT, L.; MCGOWAN, J. E. JR.; TENOVER, F. C. Testing for Induction of Clindamycin Resistance in Erythromycin-Resistant Isolates of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n.4, p. 1716–1721, 2005.

TEDESCHI, G.; TAVERNA, F.; NEGRI, A.; PICCININI, R.; NONNIS, S.; RONCHI, S.; ZECCONI, A. Serological proteome analysis of *Staphylococcus aureus* isolated from sub-clinical mastitis. **Veterinary Microbiology**, v.134, p. 388–391, 2009.

TEIXEIRA, L. M.; dos SANTOS, K. R. N.; BUERIS, V.; TRABULSI, L. R. *Staphylococcus aureus*. In: TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5 ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2008. p. 175-187.

TENOVER, F. C.; MCDOUGAL, L. K. ; GOERING, R. V.; KILLGORE, G.; PROJAN, S. J. ; PATEL, J. B.; DUNMAN, P. M. Characterization of a Strain of Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Widely Disseminated in the United States. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 1, p. 108–118, 2006.

THOMAS, D. Y.; JARRAUD, S.; LEMERCIER, B.; COZON, G.; ECHASSERIEAU, K.; ETIENNE, J.; GOUGEON, M.; LINA, G.; VANDENESCH, F. Staphylococcal Enterotoxin-Like Toxins U2 and V, Two New Staphylococcal Superantigens Arising from Recombination within the Enterotoxin Gene Cluster. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 08, p. 4724–4734, 2006.

TRABER, K. E.; LEE, E.; BENSON, S.; CORRIGAN, R.; CANTERA, M.; SHOPSIN, B.; NOVICK, R. P. agr function in clinical *Staphylococcus aureus* isolates. **Microbiology**, v. 154, p. 2265–2274, 2008.

TREMAINE, M. T.; BROCKMAN, D. K.; BETLEY, M. J. Staphylococcal Enterotoxin A Gene (*sea*) Expression Is Not Affected by the Accessory Gene Regulator (*agr*). **Infection and Immunity**, v. 61, n.1, p. 356-359, 1993.

TSENG, C. W.; ZHANG, S.; STEWART, G. Accessory Gene Regulator Control of Staphylococcal Enterotoxin D Gene Expression. **Journal of Bacteriology**. v. 186, n. 6, p. 1793-1801, 2004.

VASUDEVAN, P.; NAIR, M. K. M.; ANNAMALAI, T.; VENKITANARAYANAN, K. S. Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. **Veterinary Microbiology**. v. 92, p. 179–185, 2003.

VAUTOR E.; CARSENTI-DELLAMONICA H., SABAH M., MANCINI G.; PÉPIN, M.; DELLAMONICA, P. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates recovered from dairy sheep farms (*agr* group, adherence, slime, resistance to antibiotics). **Small Ruminant Research**. v. 72, p. 197–199, 2007.

VIANELLO, M. P.. Caracterização genotípica dos fatores de virulência e seu regulador *agr* em cepas *Staphylococcus aureus* sensíveis a oxacilina. **Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas)** - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

WALTHER , B.; WIELER, L. H.; FRIEDRICH, A. W.; HANSSEN, A. ; KOHN, B.; BRUNNBERG, L.; LÜBKE-BECKER, A. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from small and exotic animals at a university hospital during routine microbiological examinations. **Veterinary Microbiology**, 2007.

WINZER, K.; WILLIAMS, P. Quorum sensing and the regulation of virulence gene expression in pathogenic bacteria. **Internacional Journal of Medical Microbiology**, v. 291, p.131-143, 2001.

WONG , A. C. L.; BERGDOLL, M. S. Staphylococcal Food Poisoning. In: CLIVER, D.; RIEMANN, H. **Foodborne diseases**. 2th ed. Amsterdam: Academic Press,. p. 231-248, .2002.

WRIGHT, J. D.; HOLLAND, K.T. The effect of cell density and specific growth rate on accessory gene regulator and toxic shock syndrome toxin-1 gene expression in *Staphylococcus aureus*. **Microbiology Letters**, v. 218, p. 377-383, 2003.

YARWOOD, J. M.; MCCORMICK, J. K.; PAUSTIAN, M. L.; KAPUR, V.; SCHLIEVERT1, P. M. Repression of the *Staphylococcus aureus* Accessory Gene

Regulator in Serum and In Vivo. **Journal of Bacteriology**, v. 184, n. 4, p. 1095–1101, 2002.

YOON, H.J.; CHOI, Y.J.; LEE, K.; YONG, D.; KIM, J. M.; SONG, Y. G. Accessory Gene Regulator Group Polymorphisms in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: An Association with Clinical Significance. **Yonsei Medical Journal**, v. 48, n. 02, p. 176-183, 2007.

ZADOKS, R. N.; LEEUWEN, W. B.; KREFTY, D.; FOX, L. K.; BARKEMA, H.W., SCHUKKEN, Y. H.; VAN BELKUM A. Comparison of *Staphylococcus aureus* Isolates from Bovine and Human Skin, Milking Equipment, and Bovine Milk by Phage Typing, Pulsed-Field Gel Electrophoresis, and Binary Typing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 11, p. 3894–3902, 2002.

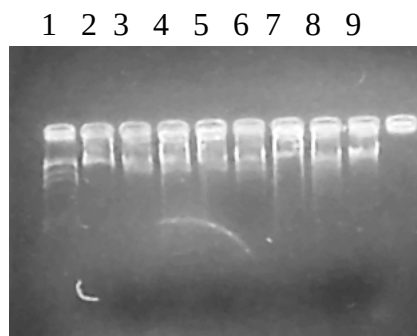
ZHANG, S.; IANDOLO, J. J.; STEWART, G. C. The enterotoxin D plasmid of *Staphylococcus aureus* encodes a second enterotoxin determinant (sej). **Microbiology Letters**, v. 168, p. 227-233, 1998.

ZHANG, S.; STEWART, G. Characterization of the Promoter Elements for the Staphylococcal Enterotoxin D Gene. **Journal Of Bacteriology**. v. 182, n. 8, p. 2321–2325, 2000.

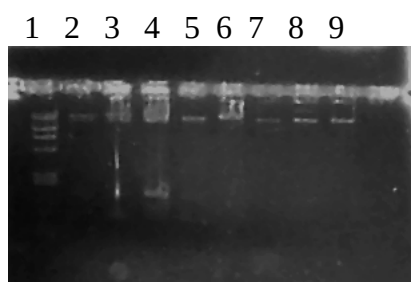
ZOCHE, F. Identificação de *Staphylococcus aureus* produtores de enterotoxina A, B, C2 e D por Multiplex-PCR e ELISA indireto, 2005. **Dissertação (Mestrado em Ciências)** – Faculdade de Agronomia “Eliseu Maciel”, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

ZOCHE, F.; FRANÇA, RODRIGO CORREA, ALEIXO, JOSÉ ANTÔNIO GUIMARÃES; MOREIRA, A. N.; SILVA, WLADIMIR PADILHA DA. PCR MULTIPLEX Para detecção de *Staphylococcus aureus* enterotoxigênicos isolados de alimentos de origem animal no sul do rio grande do sul, brasil. **Interciência (Caracas)**, v. 34, p. 487-491, 2009.

APÊNDICE 1: Fotos mostrando o DNA extraído em isolados de alimentos



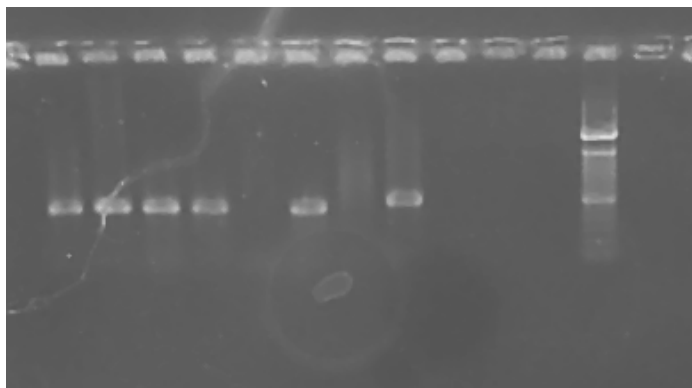
Eletroforese em gel de agarose a 1%, de DNA extraído de *S. aureus* isolados de diversas fontes de alimentos. Coluna 1: Marcador de massa molecular DNA/*Hind*III (Invitrogen®); Colunas 2 à 9: DNA extraído de isolados de diversas fontes de alimentos.



Eletroforese em gel de agarose a 1%, de DNA extraído de *S. aureus* padrão para os grupos *agr I*, *agr II*, *agr III*, *agr IV* e de cepas de leite de vacas com mastite isoladas em Viçosa, MG. Coluna 1: Marcador de massa molecular DNA/*Hind*III (Invitrogen®); Colunas 2 à 5: DNA extraído de cepas de *S. aureus* padrão para os grupos *agr I*, *agr II*, *agr III* e *agr IV*. Colunas 6 à 9: DNA extraído de cepas de leite de vacas com mastite isoladas em Viçosa, MG.

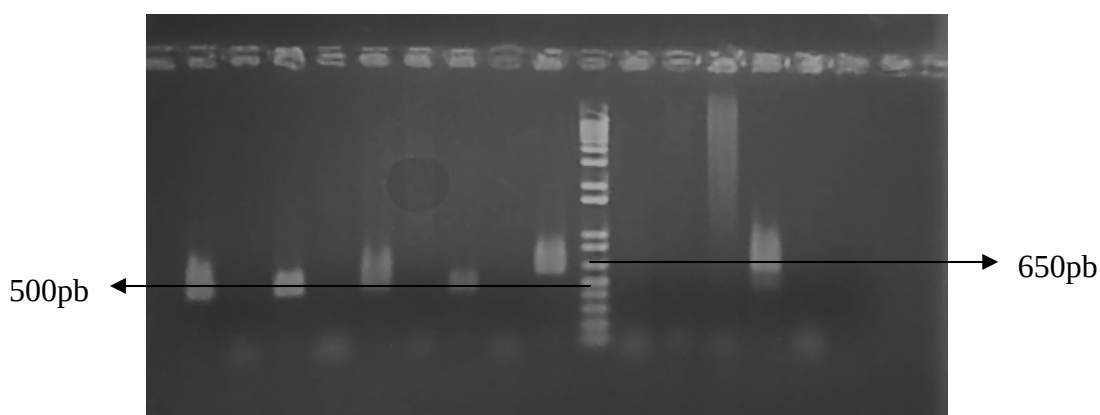
APÊNDICE 2: Fotos mostrando ampliações de fragmentos dos genes do grupos *agr* em *S. aureus* isolados de diversas fontes de alimentos e leite de vacas mastíticas

01 02 03 04 05 06 07 08 09 10 11 12



Eletroforese em gel de agarose 1,2%, de produtos de PCR realizada com DNA de *S. aureus* padrão para os grupos *agr* I, *agr* II, *agr* III, *agr* IV e cepas oriundas de carne de frango – Coluna 1 à 4: fragmento do grupo *agr* II (552pb) obtido a partir de DNA de *S. aureus* isolado de carne de frango; Coluna 5, 7, 9 e 10: não houve amplificação; Coluna 06: controle positivo de reação com fragmento do grupo *agr* II (552pb) obtido a partir de DNA de *S. aureus* USA 100, Coluna 8: controle positivo da reação com fragmento do grupo *agr* IV (588pb) obtido a partir de DNA de *S. aureus* RN 4850; Coluna 11: Controle negativo; Coluna 12: Marcador de massa molecular DNA *Ladder* 100pb (Invitrogen®).

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15



Eletroforese em gel de agarose 1,2%, de produtos de PCR realizada com DNA de *S. aureus* padrão para os grupos *agr* I, *agr* II, *agr* III, *agr* IV e cepas de leite de vacas com mastite isoladas em Viçosa MG – Coluna 1, 3, 5, 7: fragmento do grupo *agr* I (440pb) obtido a partir de DNA de *S. aureus* isolado de leite de vacas com mastite; Coluna 9: fragmento do grupo *agr* IV (588pb) obtido a partir de DNA de *S. aureus* isolado de leite de vacas com mastite; Colunas 2, 4, 6, 8, 11, 12 e 13: não houve amplificação; Coluna 10: Marcador de massa molecular DNA *Ladder* 1 kb plus (Invitrogen®); Coluna 14: controle positivo de reação com fragmento do grupo *agr* IV (588pb) obtido a partir de DNA de *S. aureus* RN 4850; Coluna 15: Controle negativo.