

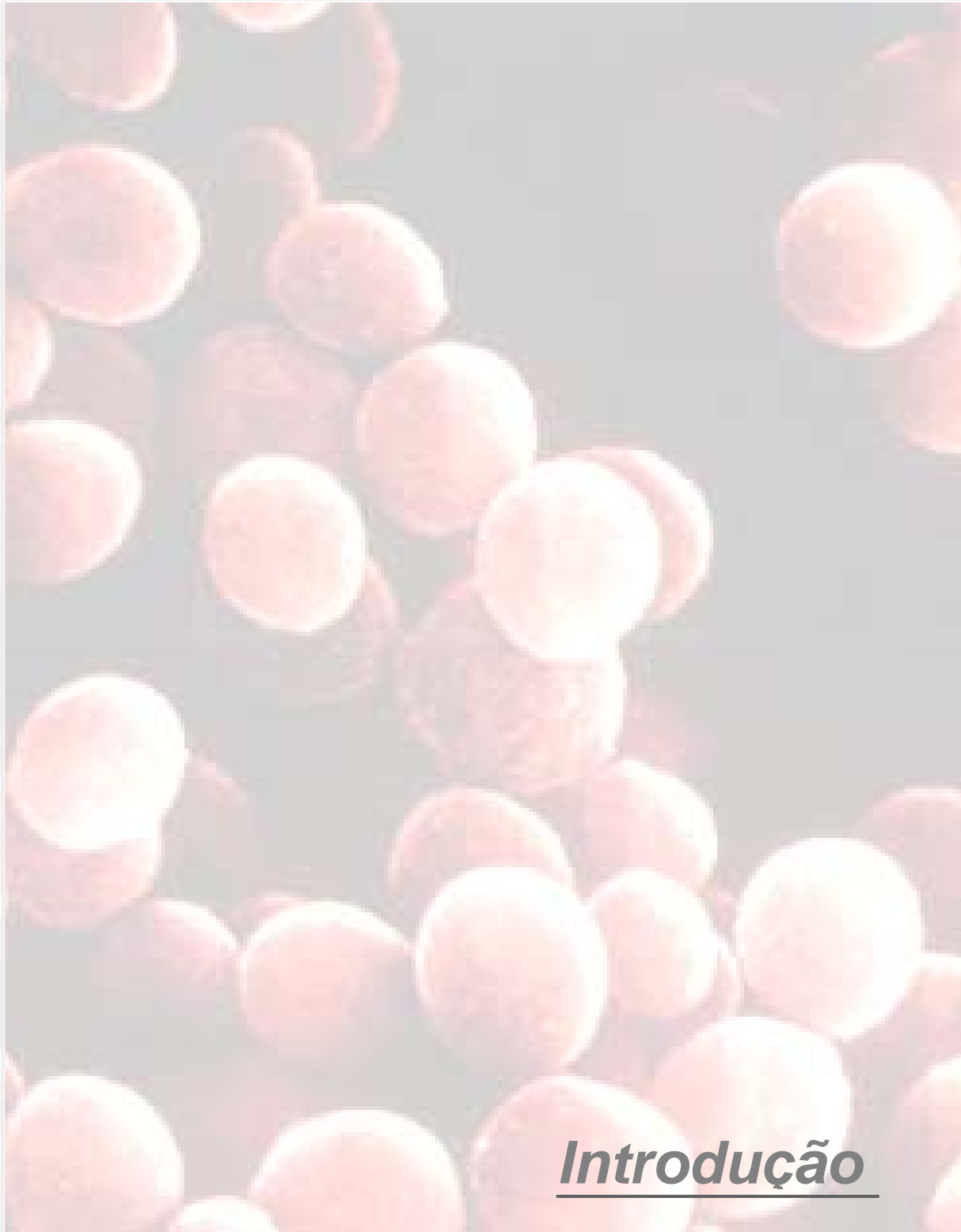
Regina Adriana de Oliveira Calsolari

Determinação do perfil toxigênico em  
*Staphylococcus aureus* e estafilococos coagulase-  
negativa isolados de recém-nascidos pela  
técnica de RT-PCR.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação  
em Doenças Tropicais da Faculdade de Medicina de  
Botucatu-Universidade Estadual Paulista-UNESP, para  
obtenção do Título de Mestre em Doenças Tropicais  
(Modalidade Biologia Tropical).

Orientador: *Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha*

BOTUCATU  
2006



## *Introdução*

## 1. INTRODUÇÃO

As bactérias do gênero *Staphylococcus* compreendem diversas espécies e subespécies, que se encontram amplamente distribuídas na natureza, sendo principalmente encontradas na pele e membranas mucosas de aves e mamíferos. São formadas por cocos Gram-positivos, que podem ser encontrados isoladamente, aos pares e na maioria das vezes agrupados formando estruturas semelhantes a cachos de uva, imóveis, não formam esporos, sendo a maioria das espécies anaeróbia facultativa.<sup>1</sup>

Podem ser divididos em dois grupos de acordo com a produção da enzima coagulase, a qual possui a capacidade de coagular ou não o plasma sanguíneo. A síntese dessa enzima é restrita a algumas espécies do gênero, destacando-se entre elas, *S. aureus*, *S. schleiferi* subsp. *coagulans*, *S. intermedius*, *S. hyicus* e *S. delphini*. Os outros estafilococos que não sintetizam a coagulase são denominados estafilococos coagulase-negativa (ECN), e destacam-se entre eles o *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. saprophyticus*, *S. cohnii*, *S. xylosus*, *S. capitis*, *S. warneri*, *S. hominis*, *S. simulans*, *S. saccharolyticus*, *S. auricularis*, *S. caprae*, *S. lugdunensis* e o *S. schleiferi* subsp. *schleiferi*.<sup>2,3</sup>

Os estafilococos geralmente mantêm uma relação benigna ou simbiótica com seus hospedeiros, contudo, se a barreira cutânea for rompida por trauma ou pela presença de artigos estranhos, esses microrganismos podem atingir outros tecidos e proliferar, desenvolvendo um comportamento patogênico.<sup>4</sup>

Os membros do gênero *Staphylococcus* são os patógenos mais comuns

encontrados no ambiente hospitalar, sendo agentes etiológicos de uma grande variedade de infecções. As infecções nosocomiais têm sido a principal causa de morbidade e mortalidade, sendo freqüentemente, agudas e pirogênicas e se não tratadas, podem causar bacteremia envolvendo vários órgãos. No gênero *Staphylococcus*, o *S. aureus* sempre foi a espécie mais importante relacionada com infecções hospitalares e continua a ser a principal causa de infecções estafilocócicas adquiridas na comunidade na maioria dos países.<sup>5</sup> As infecções mais comuns incluem furúnculos, celulite, impetigo e sítios de ferida cirúrgica. Algumas das mais sérias infecções são as bacteremias, pneumonia, osteomielite, endocardite aguda, miocardite, cerebrite, meningite, síndrome da pele escaldada e abscesso nos músculos, trato geniturinário, sistema nervoso central e vários órgãos intra-abdominais.<sup>6</sup>

Antes dos anos 70 poucos foram os relatos de infecção causada por ECN, sendo reconhecidos por clínicos e microbiologistas como contaminantes em amostras biológicas.<sup>7</sup> Atualmente, entretanto, são reconhecidos como microrganismos essencialmente oportunistas que se prevalecem de inúmeras situações orgânicas para produzirem graves infecções.<sup>2,7,8</sup> A emergência de ECN como agentes etiológicos pode ser ainda devido à valorização desse grupo de organismos como patógenos oportunistas e ao crescente uso de procedimentos invasivos, tais como cateteres intravasculares e próteses em pacientes imunocomprometidos e em tratamento intensivo, crianças prematuras, pacientes com neoplasia e em transplantados.<sup>7</sup> Dados de 1995 a 1998 do SCOPE (Surveillance and Control of Pathogens of Epidemiologic Importance) revelaram os ECN como os agentes etiológicos mais freqüentes nas bacteremias

nosocomiais nos USA.<sup>9</sup>

Vários fatores de virulência são responsáveis pelos sintomas e gravidade das infecções causadas por *S. aureus*. Esses fatores incluem as hemolisinas  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , e  $\delta$ , a leucocidina, as toxinas esfoliatinas A e B e um grupo de superantígenos tóxicos pirogênicos. A toxina 1 da Síndrome do Choque Tóxico (TSST-1) e as enterotoxinas estafilocócicas (EES) formam o grupo de superantígenos.<sup>3</sup>

As toxinas estafilocócicas podem ser divididas em dois grupos, de acordo com sua capacidade de lisar células. As hemolisinas citotóxicas, as quais são capazes de produzir lesão diretamente na membrana externa das células alvo<sup>10</sup>, e as também chamadas toxinas superantigênicas, que não possuem ação lítica direta, mas que podem produzir lesão através da superprodução de citocinas derivadas de células T ativadas e da série monocítica, monócitos/macrófagos.<sup>11</sup>

As toxinas estafilocócicas, denominadas superantígenos começaram a ser descritas em 1959 por Bergdoll et al.<sup>12</sup>, atualmente, são 18 as enterotoxinas sorologicamente distintas e designadas pelas letras EEA, EEB, EEC, EED, EEE, EEG, EEH, EEI, EEJ, EEK, EEL, EEM, EEN, EEO, EEP, EEQ, EER, EEU<sup>12-24</sup> e a toxina TSST-1 denominada Toxina 1 da Síndrome do Choque Tóxico.<sup>25</sup>

As enterotoxinas estafilocócicas (EES) são proteínas solúveis em água, monoméricas, globulares, com peso molecular entre 26.000 a 29.000 daltons, ricas em lisina, ácido aspártico e glutâmico, com duas cisteínas formando ponte de dissulfeto.<sup>25</sup> Apresentam-se relativamente resistentes ao calor e às enzimas proteolíticas tripsina, pepsina, renina e papaína o que permite a sua passagem

pelo trato gastrointestinal sem perda de atividade.<sup>26,27</sup>

Embora as enterotoxinas estafilocócicas sejam similares na sua estrutura e propriedades biológicas, elas diferem com respeito a localização genética, sua produção e mecanismo de regulação do gene.<sup>28,29</sup> Muitos dos genes responsáveis pelos fatores de virulência estão localizados em elementos genéticos os quais são específicos da cepa. Elementos genéticos tais como plasmídios, transposons, bacteriófagos e, mais recentemente ilhas de patogenicidade e ilhas de resistência têm sido descrito para *S. aureus*.<sup>30</sup>

Os genes responsáveis pela produção das enterotoxinas já são descritos desde 1984 quando foi possível clonar a EEA pela transferência do DNA cromossomal de um *S. aureus* enterotoxigênico em uma cepa de *Escherichia coli*.<sup>31</sup> Os genes *sea* e *see* responsáveis pela produção das EEA e EEE, respectivamente, são carregados em profagos. A EEA é composta por 257 resíduos de aminoácidos, sendo expressa no meio da fase exponencial de crescimento,<sup>32</sup> enquanto que os genes *sed* e *sej* determinantes das toxinas EED e EEJ são de origem plasmidial. A EEJ apresenta sequências similares com a EEA, EEE e EED correspondendo a 64, 63 e 51%, respectivamente (Tabela 1). A amplificação por PCR sugere que o gene *sej* pode estar presente em todos os plasmídios que codificam a EED.<sup>33</sup>

As EEC são um grupo de proteínas de origem cromossomal, altamente conservadas e apresentam três subtipos distintos: EEC<sub>1</sub>, EEC<sub>2</sub> e EEC<sub>3</sub>, baseada nas diferenças dos determinantes antigênicos.<sup>28</sup> Outras variantes moleculares das EEC têm sido descritas de acordo com o hospedeiro animal a que está relacionado, EEC<sub>bovina</sub>, EEC<sub>canina</sub>, EEC<sub>ovina</sub>.<sup>34</sup>

O gene *seb* responsável pela produção da EEB pode ser de origem cromossomal<sup>35</sup> ou pode ser carregado por plasmídios.<sup>36</sup> Baseadas em suas sequências similares com as enterotoxinas clássicas (EEA-EEE), novos tipos de enterotoxinas foram descritos.<sup>23,24,37-39</sup> A Tabela 1 apresenta a porcentagem de homologia da sequência de aminoácidos (aas) de diferentes enterotoxinas estafilocócicas, e a Tabela 2 mostra o suporte genético de alguns genes que codificam essas enterotoxinas.

A quantidade de enterotoxina expressa por cada classe de enterotoxina também difere. Bergdoll<sup>40</sup> descreve que as EEB e EEC são expressas em maiores quantidades do que as outras enterotoxinas, freqüentemente na ordem de 100 µg/ml de sobrenadante de cultura, enquanto que, a produção máxima obtida para EEA, EED e EEE é usualmente menor do que 10 µg/ml.

Vários sistemas reguladores estão envolvidos na determinação da virulência de *S. aureus*, tais como os sistemas gene regulador acessório (*agr*), regulador acessório estafilocócico (*sar*) e diversos *sars* homólogos, como por exemplo o repressor de toxinas (*rot*).<sup>41-43</sup> De todos esses sistemas regulatórios existentes, os mais caracterizados são o *agr* e o *sar*.<sup>44</sup>

**Tabela 1** - Porcentagem de homologia entre os aminoácidos de diferentes classes de enterotoxinas estafilocócicas.

Toxina	EEA	EEB	EEC1	EED	EEE	EEG	EEH	EEI	EEJ	EEM	EEN	EEO
EEA	100	33	30	50	83	27	37	39	64	35	39	27
EEB		100	68	35	32	43	33	31	33	29	32	36
EEC1			100	31	29	41	27	26	30	26	29	33
EED				100	52	27	35	33	51	41	38	39
EEE					100	27	35	35	63	37	39	37
EEG						100	34	28	29	28	31	30
EEH							100	33	35	38	34	31
EEI								100	34	31	31	57
EEJ									100	38	42	33
EEM										100	28	31
EEN											100	42
EEO												100

EEA: enterotoxina A; EEB: enterotoxina B; EEC: enterotoxina C; EED: enterotoxina D; EEE: enterotoxina E; EEG: enterotoxina G; EEH: enterotoxina H; EEI: enterotoxina I; EEJ: enterotoxina J; EEM: enterotoxina M; EEN: enterotoxina N; EEO: enterotoxina O.

Fonte: Loir et al., 2003.

No locus *agr*, dois promotores com orientações opostas, P<sub>2</sub> e P<sub>3</sub>, produzem dois transcritos, RNAII e RNAIII, respectivamente. O RNAIII é formado por 510 nucleotídeos responsáveis pela transcrição de genes de muitos fatores de virulência, como toxinas extracelulares, enzimas e proteínas de superfície celular presentes em *Staphylococcus aureus*.<sup>27</sup> A síntese do RNAIII é induzida quando a concentração de um polipeptídeo autoindutor (AIP), específico no meio, atinge determinados níveis que geralmente são detectados na passagem da fase exponencial de crescimento para a fase estacionária.

**Tabela 2 – Suporte genético de alguns genes de enterotoxinas estafilocócicas.**

Gene	Localização genética	Referências
<i>sea</i>	profago	Betley e Makalanos, 1985; Betley,1994
<i>seb</i>	cromossomo, plasmidio, transposon	Shafer e Iandolo, 1978; Shalita et al,1977; Altboum et al.,1985
<i>sec<sub>bov</sub></i>	Ilhas de patogenicidade	Fitzgerald et al.,2001
<i>sed</i>	plasmidio (pIB485)	Bayles and Iandolo,1989
<i>see</i>	fago defeituoso	Couch et al.,1988
<i>seg</i>	egc, cromossomo	Jarraud et al.,2001
<i>sei</i>	egc, cromossomo	Jarraud et al.,2001
<i>sej</i>	plasmidio (pIB485)	Zhang et al., 1998
<i>sek</i>	Ilhas de patogenicidade	Orwin et al.,2001
<i>sel</i>	Ilhas de patogenicidade	Fitzgerald et al., 2001
<i>sem</i>	egc, cromossomo	Jarraud et al., 2001
<i>sen</i>	egc, cromossomo	Jarraud et al., 2001
<i>seo</i>	egc, cromossomo	Jarraud et al., 2001

*sea*: gene da enterotoxina A; *seb*: gene da enterotoxina B; *sec<sub>bov</sub>*: gene da enterotoxina C; *sed*: gene da enterotoxina D; *see*: gene da enterotoxina E; *seg*: gene da enterotoxina G; *sei*: gene da enterotoxina I; *sej*: gene da enterotoxina J; *sek*: gene da enterotoxina K; *sel*: gene da enterotoxina L; *sem*: gene da enterotoxina M; *sen*: gene da enterotoxina N; *seo*: gene da enterotoxina O; *egc*: *enterotoxin gene cluster*.

Fonte: Loir et al., 2003.

O RNAII por sua vez é formado por quatro genes *agr* (gene regulador acessório), *agrB*, *agrD*, *agrC* e *agrA*, arrançados em um operon (*agr*), e juntos trabalham para induzir a síntese do RNAIII. Além de seu papel de regulador, o RNAIII é também um mRNA que codifica a hemolisina delta em estafilococos. Esta hemolisina possui a propriedade de formar poros em membranas e lisar eritrócitos.<sup>45</sup> Em *S. aureus* essa hemolisina é um polipeptídeo formado por 44 aminoácidos, enquanto que em *S. epidermidis* é composto por 26 aminoácidos.

Um operon *agr* têm sido demonstrado também em algumas espécies de estafilococos coagulase-negativa. Em estudo realizado por alguns autores,<sup>46</sup> foi detectado RNAIII em espécies de *S. lugdunensis*, entretanto o mRNA

detectado não codificou a toxina delta e seu papel na regulação do gene não é conhecido. Outros autores<sup>47</sup> descreveram um locus *agr* em *S. epidermidis* com uma homologia de 68% quando comparado com o locus *agr* de *S. aureus*. O RNAlI de *S. epidermidis* semelhante ao *S. aureus*, também codifica as proteínas AgrA, B, C, e D envolvidas no sistema de regulação dos genes responsáveis pela produção de toxinas. Esses mesmos autores também investigaram a produção de toxina delta em 23 amostras de *S. epidermidis* e demonstraram sua presença em 21 amostras a qual foi produzida durante a fase pós-exponencial.<sup>47</sup>

Além dos vários sistemas responsáveis pela regulação dos fatores de virulência de *Staphylococcus* spp. alguns fatores do meio, tais como tamanho do inóculo, concentração de oxigênio, temperatura, pH, concentração de NaCl, íons minerais e composição do meio atuam como estímulos externos na regulação do sistema, interferindo na produção de proteína A (proteína de superfície), bem como de muitas outras proteínas secretadas, atuando independentemente de *agr* ou interagindo com ele.<sup>48</sup>

Em relação ao pH, observa-se que a produção de enterotoxinas não ocorre em pH acima de 9.0 e abaixo de 5.0, sendo que, em pH 8.0 ocorre a diminuição de sua produção em 50%. O pH ótimo para produção de EEB e EEC é 6.8, enquanto que, a produção de EEA pode ocorrer entre 5.3 a 6.8.<sup>49</sup>

As enterotoxinas são termoestáveis e sua inativação depende da temperatura, bem como, da pureza, composição e pH do meio. Estudos realizados por alguns autores demonstram que a EEC é a mais termoestável das enterotoxinas, seguida pelas EEB e EEA.<sup>50</sup>

Alguns estudos analisaram a produção de EEA e EEB por ECN em

diferentes temperaturas, valores de pH e concentração de NaCl, sendo que a maior produção ocorreu à temperatura de 39,4°C em pH 7,0. Quando se aumentou a temperatura a 41°C em pH 4,5 e concentração de NaCl de 12%, houve inibição na produção de enterotoxinas.<sup>51</sup>

A intoxicação estafilocócica ocorre após a ingestão de alimentos contaminados com as enterotoxinas produzidas por bactérias do gênero *Staphylococcus*, sendo o *S. aureus* o principal agente. Entretanto, alguns autores têm relatado o isolamento de outras espécies coagulase positiva enterotoxigênicas, como *S. intermedius* e *S. hyicus*.<sup>52,53</sup>

Estudos também relatam a enterotoxigenicidade de estafilococos coagulase-negativa, incluindo *S. cohnii*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *S. sciuri*, *S. warneri*, *S. chromogenes* e *S. lentus*.<sup>30,54-62</sup>

Os principais sintomas, os quais ocorrem de 1 a 6 horas após a ingestão da toxina são náuseas, vômitos, diarreias, dor abdominal, dor de cabeça e cãibra muscular. O quadro clínico é relativamente brando, com duração de algumas horas a um dia, podendo, algumas vezes, se apresentar severo e requerer hospitalização. Isso ocorre em virtude da quantidade ingerida e da suscetibilidade do indivíduo, incluindo desidratação, cefaléia, sudorese e alteração da temperatura corporal. As mortes são raras, porém, têm ocorrido em crianças e idosos.<sup>4</sup>

Vários estudos destacam a contaminação de alimento por portadores assintomáticos de *S. aureus*. E segundo Carmo,<sup>63</sup> na maioria das intoxicações estafilocócicas, a contaminação do alimento ocorre pelos manipuladores. Estudos descrevem o ser humano como principal reservatório de *S. aureus* e afirmam que

20 a 50% das pessoas normais apresenta esse microrganismo no vestíbulo nasal e orofaringe.<sup>27</sup>

Vários estudos descrevem a presença de *S. aureus* enterotoxigênicos isolados de manipuladores de alimentos, alguns inclusive associados a surtos de intoxicação alimentar onde se detectou a presença das enterotoxinas dos tipos EEA – EEE.<sup>63-67</sup>

Alguns autores investigando trabalhadores em restaurantes no Kwait obtiveram 14,1% de ECN toxigênicos de um total de 142 amostras isoladas de mãos e 13 amostras isoladas das fossas nasais. As amostras de ECN pertenciam as espécies *S. epidermidis*, *S. hominis*, *S. warneri*, *S. saprophyticus*, *S. xylosus*, *S. haemolyticus* e *S. schleiferi*, as quais produziram as enterotoxinas EEA, EEB, EEC e a TSST-1, sendo a EEB a enterotoxina predominante.<sup>60</sup>

Não se conhece exatamente a quantidade necessária da enterotoxina responsável em causar a intoxicação alimentar. Em um estudo realizado com voluntários humanos, aos quais foi administrada a enterotoxina, estima-se que apenas 1-5µg / 70Kg seria capaz de desencadear os sintomas.<sup>6</sup> Evenson et al.<sup>68</sup> descreveram um surto que envolveu crianças após a ingestão de leite achocolatado contaminado. A concentração da enterotoxina encontrada foi de apenas 0,5 ng de EEA/ml .

Dentre as enterotoxinas estafilocócicas, a EEA é a mais comumente envolvida em surtos de intoxicação alimentar nos EUA, correspondendo a 77,7%<sup>69</sup> e 81-90% em Taiwan.<sup>70</sup> Além disso, o *S. aureus* é capaz de produzir mais de uma enterotoxina simultaneamente, conforme observado por Nicolau.<sup>71</sup>

Além de seu importante papel nas intoxicações alimentares estafilocócicas, as enterotoxinas também possuem a capacidade de ativar a proliferação inespecífica de células T, sendo por isso denominadas superantígenos.

Os superantígenos bacterianos são capazes de ativar inespecificamente as células T, por se ligarem, pelo lado externo, ao domínio V $\beta$  do receptor de célula T e à cadeia  $\alpha$  da molécula MHC de classe II presente nas células apresentadoras de antígenos, sem serem previamente processados. Esta ligação produz um sinal, que induz a proliferação e ativação policlonal de cerca de 10 a 30% do repertório de célula T, sendo as células T CD4 a população responsiva predominante. Assim, tem-se uma grande produção de citocinas pró-inflamatórias provenientes de células T, como o IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-2, e provenientes também de monócitos, tais como IL-1 e TNF- $\alpha$ . A produção maciça de citocinas pró-inflamatórias desencadeia uma reação inflamatória intensa causando danos aos tecidos do hospedeiro.<sup>72</sup>

A TSST-1<sup>25</sup> é responsável pela Síndrome do Choque Tóxico (TSS), doença aguda sistêmica caracterizada por febre, hipotensão arterial, "rash" cutâneo e descamação da pele. Por outro lado, ocasionalmente linhagens isoladas de pacientes com TSS não produzem TSST-1. Ao que tudo indica as enterotoxinas A, B e C podem estar relacionadas com as manifestações clínicas da doença.<sup>6</sup> A TSS anteriormente associada à utilização de tampão vaginal, pode ocorrer após qualquer infecção estafilocócica causada por uma linhagem produtora de TSST-1,

sendo o *S. aureus* a principal espécie envolvida.<sup>73</sup> No entanto alguns relatos indicam a produção de TSST-1 também por ECN.<sup>60,74-77</sup>

Tarkowski & Wagner,<sup>78</sup> descreveram a artrite séptica como causa da ação de enterotoxinas produzidas por espécies de *S. aureus* enterotoxigênicas que ao ativar uma resposta inflamatória exagerada mediada pela ação de citocinas ativam grande quantidade de células T e macrófagos responsáveis pelos danos teciduais.

Resultados semelhantes são descritos por Bremell & Tarkowski<sup>79</sup> em um modelo experimental com inoculação de enterotoxinas estafilocócidas em ratos, ao demonstrar que 100% dos ratos que receberam as enterotoxinas EEA, EEB, EEC e EED desenvolveram artrite. A mortalidade também foi preferencialmente induzida com ratos inoculados com EEB e EED de *S. aureus*.

Efuntoye & Adetosoye,<sup>80</sup> analisando 107 amostras de *Staphylococcus* isoladas de fezes de crianças com 5 anos de idade, as quais apresentavam diarreia esporádica, obtiveram 72 cepas de *S. aureus*, 33 de *S. epidermidis* e 2 de *S. saprophyticus*. Das 72 amostras de *S. aureus* isoladas, 61 (84,7%) foram produtoras de enterotoxinas. A EEA foi a enterotoxina predominante, sendo produzida por 37 (60,7%) das cepas enterotoxigênicas de *S. aureus*, 12 (19,7%) produziram apenas EEB, 2 cepas produziram EEA e EEC, 6 cepas produziram EEA, EEC e EED e apenas 1 cepa produziu EEA, EEB e EED.

Em estudo recente realizado por Berstein et al.,<sup>81</sup> esses autores sugerem o possível papel das enterotoxinas estafilocócicas na sinusite com polipose nasal. Nesse estudo 55% dos pacientes investigados apresentaram *S. aureus* enterotoxigênico na mucosa nasal adjacente aos pólipos, onde três

diferentes enterotoxinas foram isoladas EEA, EEB e TSST-1.

As enterotoxinas estafilocócicas também têm participação em outros processos patológicos graves, estando envolvidas em sepses, osteomielites e na síndrome da angústia respiratória, que é caracterizada por uma disfunção pulmonar quase sempre associada a um processo séptico.<sup>82</sup>

Diversos métodos foram desenvolvidos para detectar a presença de enterotoxinas sendo os imunoenaios os métodos mais utilizados devido a sua simplicidade e sensibilidade. Eles são baseados no uso de anticorpos policlonais e monoclonais específicos para as enterotoxinas.<sup>83</sup>

O RPHA (Hemaglutinação Reversa Passiva) que utiliza a adsorção de anticorpos específicos em hemácias, foi o primeiro método empregado considerado realmente sensível, sendo capaz de detectar 1 ng/g de enterotoxina presente no alimento. As desvantagens desse método são as hemaglutinações inespecíficas e a dificuldade em se adsorver determinados anticorpos na superfície das hemácias.<sup>84</sup>

O sistema foi aperfeiçoado com a substituição dos eritrócitos por partículas de látex - RPLA (Aglutinação Reversa Passiva de látex), que aumentou a sensibilidade para 0,75 ng/g de enterotoxinas, embora ainda ocorram reações inespecíficas com determinados alimentos<sup>85</sup> e dificuldade em distinguir reações inespecíficas.<sup>86</sup>

O RIA (Radioimunoensaio) baseia-se na competição entre toxina marcada com I<sup>125</sup> e toxina não marcada, as quais competem pelo sítio de ligação dos anticorpos adsorvidos em fase sólida. Esse método apresentou-se como uma boa opção além de uma sensibilidade de 1,0 a 5,0 ng/ml<sup>87</sup>. Porém, a necessidade

de enterotoxinas altamente purificadas e a manipulação de material radioativo limitaram seu uso.

Pela necessidade de se eliminar o risco de contaminação com o RIA desenvolveu-se a técnica ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*), na qual o marcador radioativo foi substituído pela enzima e atualmente muitos deles apresentam sensibilidade de 0,1 a 1,0 ng/g de alimento<sup>88</sup>.

Além do RPLA existem outros kits disponíveis comercialmente que utilizam uma mistura de anticorpos policlonais específicos que detectam todas as enterotoxinas sem diferenciação, tais como o kit SET-EIA, o qual detecta EEA, EEB, EEC e EED, com uma sensibilidade de 0,1-1,0 ng/ml, além dos kits TECRA (Bioenterprises Pty. Ltd., Roseville, New South Wales, Austrália), TRANSIA (Transia-Diffchamb S. A. Lion, France) e VIDAS (BioMérieux Vitek, Inc., Hazelwood, Missouri), capazes de detectar as EEA-EEE.<sup>89</sup>

O kit RIDASCREEN (R-Biopharm GmbH, Darmstadt, Germany) detecta individualmente as enterotoxinas EEA, EEB, EEC, EED e EEE, pois é padronizado com anticorpos monoclonais e apresenta uma alta sensibilidade (0,2-0,4 ng/ml) e especificidade, necessitando de três horas para a análise.<sup>90</sup>

Entretanto, nem sempre esses métodos detectam linhagens produtoras de toxinas, porque sua produção depende das condições de crescimento que não representam condições *in vivo*<sup>91</sup>. Além disso, os métodos imunológicos podem produzir resultados falso-positivos devido a reações cruzadas entre antígenos e a ocorrência de reações inespecíficas.<sup>85</sup>

Com o desenvolvimento da biologia molecular, algumas técnicas têm sido propostas para a detecção do gene responsável pela produção das toxinas.

Uma das primeiras técnicas utilizadas foram os nucleotídeos “probes” , que correspondem a sequências de nucleotídeos marcados com substâncias radioativas, biotina, grupos sulfonil ou fosfatase alcalina. Os “probes” hibridizados são então lidos através de auto-radiografia ou colorimetria.<sup>92</sup>

Atualmente, a PCR ( *Polymerase Chain reaction*), é um dos métodos mais utilizados pois permite a identificação de genes responsáveis pela produção de enterotoxinas com alta sensibilidade e especificidade. Foram desenvolvidos protocolos para a detecção dos genes utilizando-se a sequência de oligonucleotídeos obtidos pela análise computadorizada das sequências dos genes *sea*, *seb*, *sec*, *sed* e *see* de enterotoxinas estafilocócicas EEA, EEB, EEC, EED e EEE, respectivamente.<sup>93</sup> Posteriormente em estudo realizado por Jarraud,<sup>94</sup> esse autor incluiu em seus estudos as sequências referentes aos genes das enterotoxinas G e I.

Em um estudo realizado por Padmaprya<sup>95</sup>, esse autor sugere a identificação de cepas enterotoxigênicas de espécies de *Staphylococcus* pela identificação de um gene regulador acessório (*sar*). Utilizando *primers* específicos para o *sar*, esse autor detectou 49 *sar*-positivos de um total de 67 amostras. Os resultados foram comparados com uma PCR realizada para os genes das enterotoxinas A, B, C e D que revelou a presença dos genes das enterotoxinas em todas as amostras *sar*-positivas.

Rosec & Gigaud,<sup>96</sup> investigando amostras de ECN e *S. aureus* isoladas de diferentes alimentos em restaurantes na França, não obtiveram amostras com genes toxigênicos entre as 74 amostras isoladas de ECN, enquanto que das 258 amostras de *S. aureus* testadas, 76 apresentaram genes de toxinas. No Brasil,

Cunha,<sup>77</sup> investigando a presença de genes toxigênicos em amostras de ECN isoladas de alimentos, pela técnica de PCR, encontraram 10% de amostras positivas, sendo 25% para o gene *sec-1* e 75% para o gene *sea*. Entretanto, outros autores não obtiveram resultados positivos em amostras de ECN. Becker<sup>97</sup> investigando a presença de genes de toxinas pela técnica de PCR multiplex em amostras de ECN e outras espécies de coagulase-positiva não-*S. aureus* isoladas de materiais clínicos, não detectaram genes de toxinas nas amostras testadas.

Cunha<sup>98</sup> utilizaram a técnica de PCR para a detecção dos genes responsáveis pela produção de enterotoxinas em linhagens de estafilococos isolados de recém-nascidos. Os resultados obtidos com a PCR foram comparados com o método RPLA. Do total de 120 isolados de *S. aureus*, 38,3% foram produtores de enterotoxinas pelo RPLA, enquanto que a PCR detectou 46,6% de amostras positivas. Os estafilococos coagulase-negativa apresentaram 40,0% de linhagens positivas pelo PCR comparado com 26,7% pelo método RPLA.

Cunha<sup>98</sup> verificaram a produção de TSST-1 e de EEB + EEC em *S. epidermidis* e das associações EEA + EEB e EEA + EEC em *S. aureus*, as quais não foram confirmadas como positivas quando submetidas à pesquisa desses genes pelo método de PCR. Tsen & Chen<sup>99</sup> também encontraram linhagens de *S. aureus* positivas pelo RPLA e negativas pelo PCR. Essa é uma das desvantagens apresentadas pelos métodos imunológicos nos quais podem ocorrer reações falso-positivas.

Essas desvantagens não são verificadas na detecção direta dos genes responsáveis pela produção de toxinas. Segundo Schmitz et al.<sup>100</sup> para considerações práticas, as linhagens de estafilococos positivas para a detecção

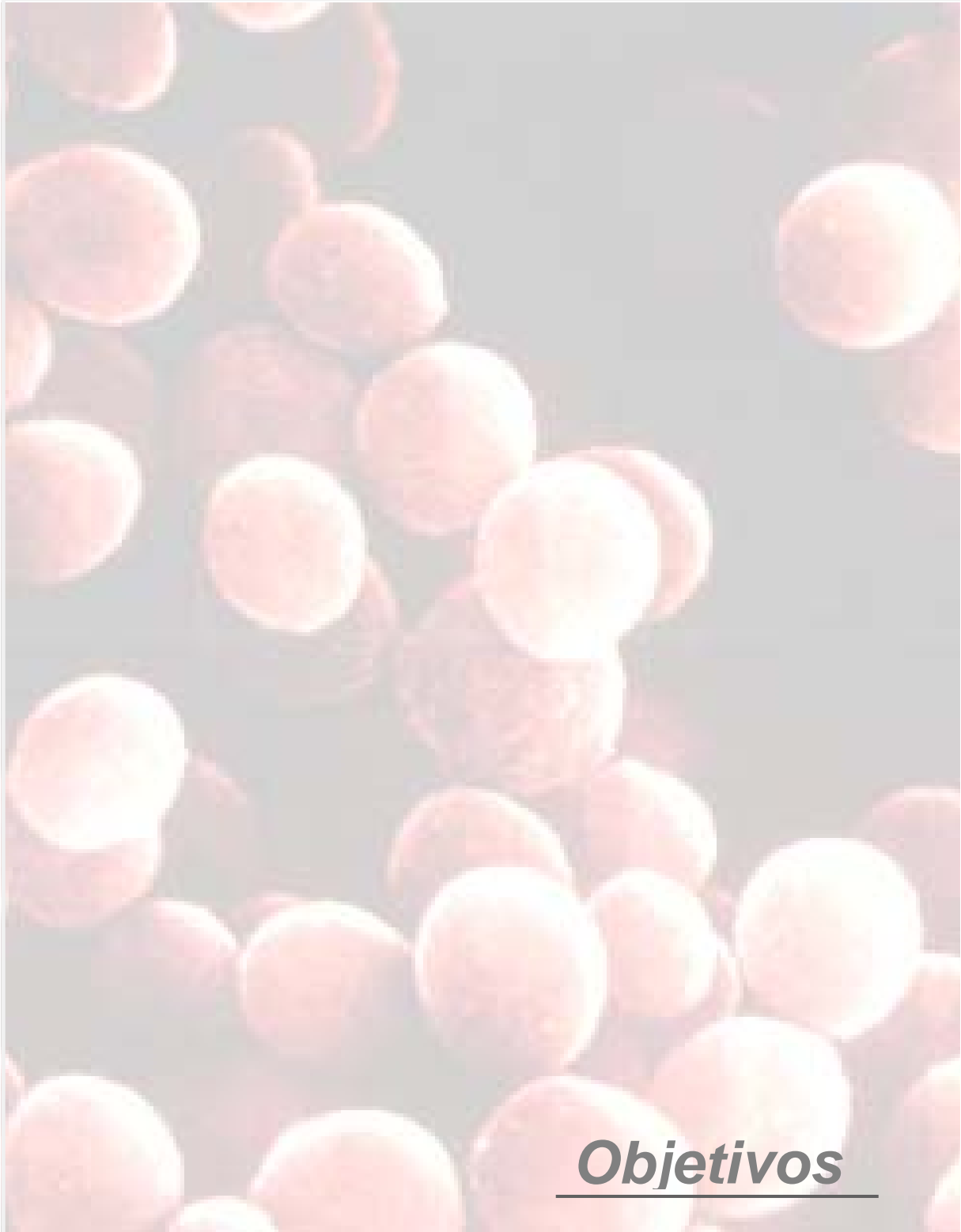
do gene poderiam ser consideradas linhagens com potencial para produção dessas toxinas, já que a produção de toxina *in vivo* não pode ser excluída. A técnica de PCR permite ainda a identificação genotípica de várias espécies de estafilococos com alta sensibilidade e especificidade. Couto<sup>101</sup> utilizando a técnica ITS-PCR (Internal transcribed spacer-PCR) identificou diferentes espécies de ECN amplificando uma região extremamente conservada no gênero. Procariotos possuem genes responsáveis pela expressão do rRNA 16S, 23S e 5S. Esses genes são separados por regiões as quais mostram um alto grau de variabilidade em suas seqüências de acordo com o gênero e espécie. Essa região amplificada quando visualizada em um gel de poliacrilamida, mostra um padrão de bandas específico para cada espécie de ECN. Utilizando os seus respectivos ATCC, pode-se comparar o padrão de bandas das amostras de referência com as amostras investigadas, não restando dúvidas quanto a identificação precisa das diferentes espécies de estafilococos.

Embora na literatura existam relatos de genes toxigênicos em espécies de ECN, muitos autores ainda contestam o seu potencial toxigênico, sendo a identificação genotípica importante para a confirmação de espécies de ECN. Lotter & Genigeorgis<sup>102</sup> afirmaram não acreditar que estafilococos coagulase-negativa possam produzir enterotoxinas e sugeriram a possibilidade de erro na identificação da espécie. Posteriormente, Fox et al.<sup>103</sup> relataram o isolamento de linhagens de *S. aureus* que produzem pouca coagulase ou não expressam essa enzima, podendo ser identificados como estafilococos coagulase-negativa. Dessa forma a identificação genotípica confirma a identificação fenotípica, excluindo a possibilidade de erro durante a identificação.

A técnica de PCR, contudo, permite a detecção de genes contidos nas linhagens independentes de sua expressão, pois mesmo o gene estando presente no microrganismo, ele pode não estar ativo. O progresso dos métodos genotípicos oferece ainda a possibilidade de detectar a seqüência de RNAm responsável pela expressão da enterotoxina alvo, utilizando a técnica de RT-PCR . A presença da seqüência de RNAm que codifica a síntese da toxina não deixa dúvidas quanto ao potencial tóxico do microrganismo.

A pesquisa do RNAm tornou-se uma ferramenta prática, pois ao se investigar a presença de genes de determinados fatores de virulência pela técnica de PCR utilizando *primers* específicos, esses mesmos *primers* podem ser utilizados para confirmar a expressão desses genes pelo cDNA do mRNA. Yarwood et al.,<sup>104</sup> utilizaram a técnica de RT-PCR *real time* para confirmar a expressão de RNAlII em amostras de *S. aureus*. Garvis et al.,<sup>44</sup> investigando o locus *agr* em amostras de *S. aureus*, utilizaram a técnica de RT-PCR para isolar o RNA de culturas de fase pós-exponencial.

As divergências existentes quanto a enteroxigenicidade dos ECN e a capacidade de causarem intoxicação alimentar e/ou outras doenças associadas, ressaltam a necessidade de mais pesquisas utilizando técnicas confiáveis que comprovem a capacidade destes estafilococos de produzirem toxinas. Assim, esse trabalho objetivou identificar amostras de *S. aureus* e ECN isoladas de materiais clínicos de RN, a detecção de genes que codificam as enterotoxinas e TSST-1 e a expressão de RNAm responsável pela produção dessas toxinas.



***Objetivos***

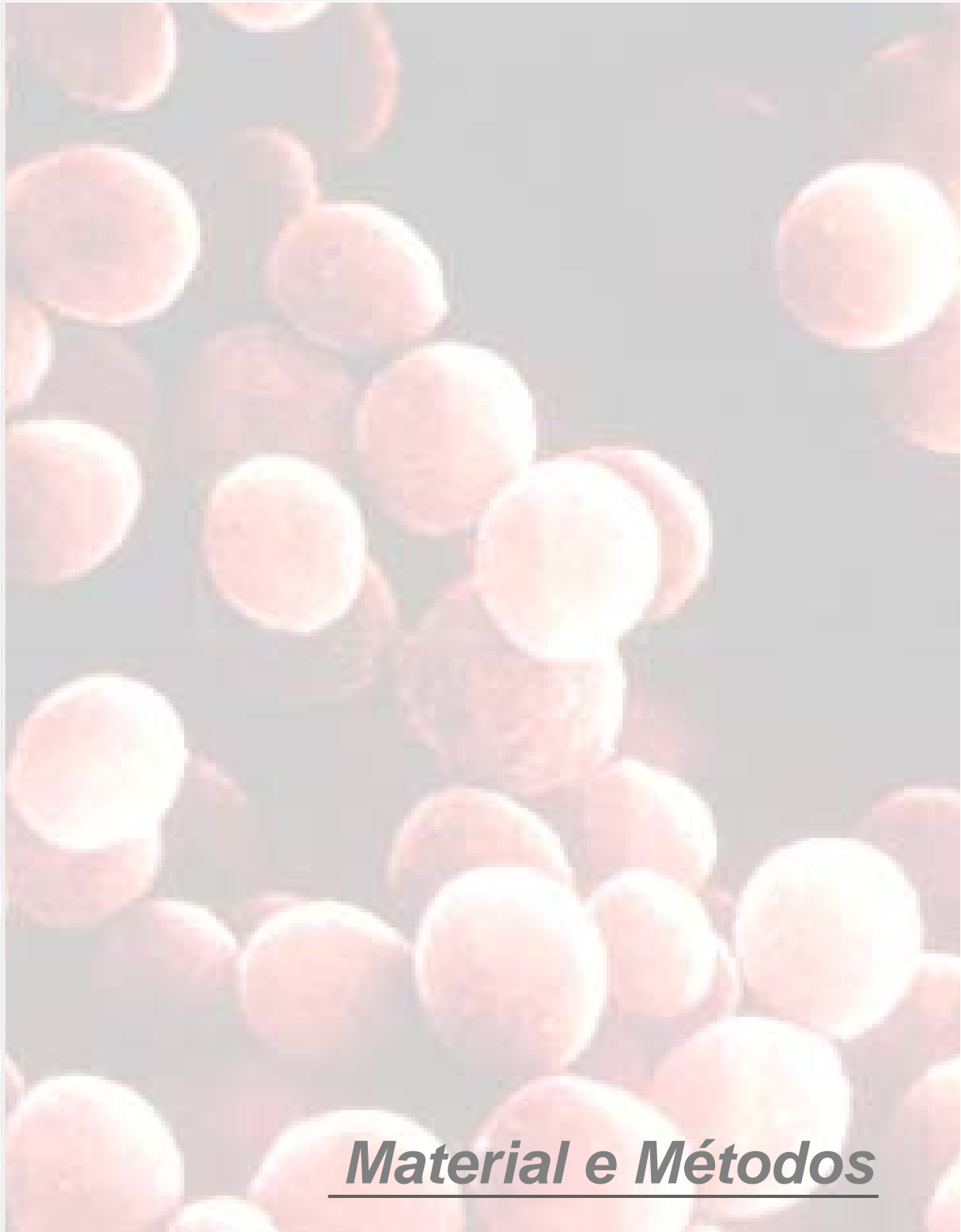
## **2. OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GERAL**

O objetivo geral desse trabalho foi avaliar o potencial toxigênico de amostras de *S. aureus* e ECN isoladas de recém-nascidos provenientes do Hospital das Clínicas (HC) da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB).

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Identificar amostras de *S. aureus* e ECN isoladas de recém-nascidos provenientes do Hospital das Clínicas (HC) da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB).
- Detectar a presença de genes que codificam as enterotoxinas A, B, C, D e TSST-1 nas amostras isoladas.
- Identificar amostras de ECN com genes de toxinas estafilocócicas pela técnica genotípica ITS-PCR.
- Detectar a expressão de RNAm que codifica as enterotoxinas A, B, C, D, e TSST-1 pela técnica RT-PCR nas amostras estudadas.



**Material e Métodos**

### **3. Material e Métodos**

#### **3.1 Microrganismos**

Foram estudadas 180 amostras de estafilococos, incluindo 90 amostras de ECN e 90 amostras de *S. aureus* isoladas de amostras biológicas provenientes de recém-nascidos internados no HC da FMB.

Linhagens de *S. aureus* toxigênicas de referência internacional foram utilizadas como controle positivo, incluindo *S. aureus* ATCC 13565 produtor de enterotoxina A (EEA), *S. aureus* ATCC 14458 produtor de EEB, *S. aureus* ATCC 19095 produtor de EEC e *S. aureus* ATCC 23235 produtor de EED.

#### **3. 2 Identificação de *S. aureus* e estafilococos coagulase-negativa**

Os isolados, foram semeados em ágar sangue, corados pelo método de Gram para observação de sua morfologia e coloração específica do gênero em estudo. Após a confirmação dessas características, as amostras foram submetidas às provas de catalase e coagulase. O gênero *Staphylococcus* foi diferenciado de *Micrococcus*, com base na prova de oxidação e fermentação da glicose e pela resistência à bacitracina (0,04 U) indicada pela ausência de halo de inibição ou formação de halo de até 9 mm e pela sensibilidade à furazolidona (100 µg) caracterizada por halos de inibição de 15 a 35 mm de diâmetro.<sup>105</sup>

##### **3. 2.1 Identificação fenotípica de estafilococos coagulase-negativa**

Para a identificação dos estafilococos coagulase-negativa, foram seguidos os critérios propostos por Kloos & Schleifer<sup>106</sup> e Kloos & Bannerman<sup>2</sup>, conforme esquema simplificado de provas bioquímicas, o qual estabelece a realização de testes de utilização de açúcares: xilose, arabinose, sacarose, trealose, manitol, maltose, lactose, xylitol, ribose e frutose, bem como da coagulase, caracterização de hemolisinas, redução de nitrato, urease, ornitina decarboxilase e resistência à novobiocina.

### **3.2.2 Identificação genotípica de estafilococos coagulase-negativa**

#### **3.2.2.1 Extração de DNA**

O DNA foi extraído a partir de linhagens de *Staphylococcus* cultivadas em ágar sangue e inoculadas individualmente em caldo de infusão de cérebro e coração (BHI) e incubadas a 37°C por 24h.

Para a extração foi utilizado o Kit GFX (*Amersham Biosciences*) que consistiu na digestão inicial das células de estafilococos com lisozima (10 mg/mL) e proteinase K (20 mg/mL). A seguir 500 µL da solução de extração foi adicionada à mistura e esta centrifugada a 10.000 x g por 4 minutos. Em seguida o sobrenadante foi transferido para a coluna GFX e centrifugado a 5.000 x g por 1 minuto. O líquido coletado foi descartado e 500 µl de solução de extração foi adicionada novamente à coluna. Após a centrifugação e descarte do líquido coletado, 500µl da solução de lavagem foi adicionada à coluna e esta submetida a centrifugação a 20.000 x g por 3 minutos. A seguir, a coluna foi transferida para

um tubo de 1,5 mL e 200 µL de água Milli Q aquecida a 70°C foi utilizada para eluição.

### 3.2.2.2 Amplificação do ácido nucléico (PCR)

A técnica genotípica utilizada para a identificação dos ECN foi a *Internal transcribed spacer* (ITS-PCR) a qual permite a identificação das diferentes espécies de *Staphylococcus* pela amplificação de uma região extremamente conservada, usando os *primers* G1 – 5' – GAAGTCGTAACAAGG e L1 – 5' – AAGGCATCCACCGT obtidos de sequências conservadas adjacentes aos genes 16S e 23 S.<sup>101</sup>

A técnica de ITS-PCR foi utilizada para identificar as amostras de ECN positivas para a produção de toxinas ou genes que codificam essas toxinas e confirmar portanto que essas amostras sejam realmente espécies de ECN e não amostras de *S. aureus* mutantes não produtoras de coagulase. Para o controle foram utilizadas linhagens ATTC de referência internacional de cada espécie de *Staphylococcus*.

As reações de PCR foram realizadas em tubos de microcentrífuga de 0,5 mL em volumes totais de 50 µL contendo 20 pmol de cada *primer*, 2,5 U de Taq DNA polimerase, 200 µM de desoxiribonucleotídeos trifosfatados, 20 mM de Tris-HCl (pH 8,4), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> e 5 µL da amostra. Em todas as reações realizadas foi utilizado um controle negativo, através da substituição do ácido nucléico por água. A incubação foi realizada em Termociclador PTC-100 MJ

Research empregando os seguintes parâmetros: desnaturação a 94 °C por quatro minutos, seguido de 25 ciclos compostos de desnaturação a 94 °C por 1 minuto, anelamento dos *primers* – rampa até 55 °C por 2 minutos seguido de mais 7 minutos a 55 °C, extensão – rampa até 72 °C por dois minutos, seguido de mais 7 minutos a 72 °C. Após completar os 25 ciclos, os tubos foram incubados a 72°C por sete minutos antes de resfriar à 4°C.

Para controle dos resultados dos testes, foram utilizadas as seguintes linhagens de referência internacional: *S. epidermidis* (ATCC 12228), *S. simulans* (ATCC 27851), *S. warneri* (ATCC 10209) e *S. xylosus* (ATCC 29979), *S. saprophyticus* (ATCC 15305), *S. hominis* (ATCC 27844), *S. aureus* (ATCC 13565), *S. aureus* (ATCC 14458), *S. aureus* (ATCC 19095), e *S. aureus* (ATCC 23235).

Para visualização dos produtos amplificados, pela técnica ITS-PCR foi realizada eletroforese em gel de poliacrilamida 1% segundo o protocolo descrito por Sambrook & Russell<sup>107</sup> e corado posteriormente com nitrato de prata 0,2%.

### **3. 3 Detecção de genes de enterotoxinas e TSST-1**

#### **3. 3. 2 Amplificação do ácido nucléico (PCR)**

As reações de PCR foram realizadas em tubos de microcentrífuga de 0,5 ml em volumes totais de 50 µL contendo 20 pmol de cada *primer* (Tabela 3), 2,5 U de Taq DNA polimerase, 200 µM de desoxiribonucleotídeos trifosfatados, 20 mM de Tris-HCl (pH 8,4), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> e 5 µL da amostra. Em todas as

reações realizadas foi utilizado um controle negativo, através da substituição do ácido nucléico por água. A incubação foi realizada em Termociclador PTC-100 MJ Research empregando os seguintes parâmetros: primeiro ciclo a 94°C por quatro minutos, desnaturação a 94°C por 2 minutos, anelamento dos *primers* a 55°C por 2 minutos e extensão a 72°C por um minuto e 30 segundos, seguido por um segundo ciclo de desnaturação a 94°C por 2 minutos, anelamento dos *primers* a 53°C por 2 minutos e extensão a 72°C por um minuto e 30 segundos. No terceiro ciclo a temperatura de anelamento foi reduzida para 51°C por 2 minutos seguido por mais 37 ciclos de desnaturação a 94°C por 2 minutos, anelamento dos *primers* a 51°C e extensão a 72°C por um minuto e 30 segundos. Após completar os 40 ciclos, os tubos foram incubados a 72°C por sete minutos antes de resfriar à 4°C.

### **3. 4 Detecção da expressão de RNAm de enterotoxinas e TSST-1 por RT-PCR**

#### **3. 4.1 Extração de RNA**

O RNA total foi extraído a partir de amostras de *Staphylococcus* spp. cultivadas em ágar sangue e inoculadas individualmente em caldo Infusão de Cérebro e Coração e incubadas a 37°C por 24 h. A extração foi efetuada com o Trizol (Invitrogen). As células foram lisadas com 1,0 mL de Trizol e o homogenato transferido para tubos de 1,5 mL e adicionado de 0,2 mL de clorofórmio e novamente homogeneizados por 3 minutos a 15-30°C. Após este processo o

homogenato foi centrifugado a 12000 x g por 15 minutos a 5°C e a fase aquosa contendo o RNA total coletada e transferida para outro tubo. A precipitação do RNA foi realizada adicionando-se 250µL de álcool isopropílico com incubação à temperatura ambiente por 10 minutos e centrifugação a 12000 x g por 10 minutos a 5°C e a lavagem do RNA total foi realizada com 1 mL de etanol 70% adicionado de 0,1% de dietilpirocarbonato (DEPC).

Ao RNA total extraído foi adicionado 25µL de água MilliQ com dietilpirocarbonato (DEPC) e RNAGuard (*Amersham Biosciences*), na concentração de 1/10, e essa mistura foi incubada por 10 minutos a 56°C. Dessa mistura de 25µL foram retirados 11µL para a obtenção do cDNA sem tratamento. Para um controle da extração de RNA total foi adicionado ao RNA restante (14µL) 1µL de Dnase RNase-Free 1U/µL (Promega Madison Wi USA) + 1µL de tampão DNase 10 x *Reaction Buffer*, para eliminar todo e qualquer DNA que pudesse ter sido extraído junto com o RNA total. A mistura foi incubada por 30 minutos a 37°C e em seguida foi adicionado 1µL de DNase *stop solution* (Promega Madison Wi USA) e incubada novamente por 10 minutos a 65°C. Para uma parte (6µL) desse RNA tratado com a DNase não foi obtido o seu cDNA e ele foi usado como um controle da ação da enzima e os 11µL restantes foram utilizados para a obtenção do cDNA.

**Tabela 3:** Oligonucleotídeos para a detecção de genes de enterotoxinas estafilocócicas e controle interno (RNAr 16 S).

<b>Nome</b>	<b>Sequência de nucleotídeos 5' a 3'</b>	<b>Alvo</b>	<b>Produto amplificado(bp)</b>
<i>sea1</i>	TTG GAA ACG GTT AAA ACG AA	Enterotoxina A	120
<i>sea2</i>	GAA CCT TCC CAT CAA AAA CA		
<i>seb1</i>	TCG CAT CAA ACT GAC AAA CG	Enterotoxina B	478
<i>seb2</i>	GCA GGT ACT CTA TAA GTG CC		
<i>sec1</i>	GAC ATA AAA GCT AGG AAT TT	Enterotoxina C	257
<i>sec2</i>	AAA TCG GAT TAA CAT TAT CC		
<i>sed1</i>	CTA GTT TGG TAA TAT CTC CT	Enterotoxina D	317
<i>sed2</i>	TAA TGC TAT ATC TTA TAG GG		
<i>tst1</i>	ATG GCA GCA TCA GCT TGA TA	TSST-1	350
<i>tst2</i>	TTT CCA ATA ACC ACC GCT TT		
<i>RNAr 16S 1</i>	CCT ATA AGA CTG GGA TAA CTT CGG G	RNAr 16S	791
<i>RNAr 16S 2</i>	CTT TGA GTT TCA ACC TTG CGG TCG		

Fonte: Johnson et al., 1991; Mason et al., 2001.

### 3. 4. 2 Obtenção do cDNA

Em um microtubo de 0,5 mL ("RNase/DNase free") com 11 µL de amostra (2,5 µg de RNA total) foi adicionado 1 µL de *random primer* a 75 ng/µL. Em seguida, a mistura foi aquecida por 10 minutos a 70 °C para a desnaturação do RNA e resfriada rapidamente a 4°C. Posteriormente foi adicionada à mistura 4 µL do tampão para a transcriptase reversa (*first strand buffer 5x*), 2 µL de dietiltreitol (DTT) 0,1M e 1µL de nucleotídeos (dNTP mix 20mM) e em seguida a reação foi aquecida por 2 minutos a 25 °C para ligação do *primer*. Após

aquecimento, 1µL de transcriptase reversa, Superscript™ RT III (Invitrogen) foi adicionada à reação e a mistura levada ao Termociclador PTC-100 MJ Research para obtenção do cDNA.

Para obtenção do cDNA, foram utilizados ciclos de 25 °C por 5 minutos, 42 °C por 50 minutos e 70°C por 15 minutos e resfriado a 4°C. O cDNA obtido foi armazenado a -20°C até o momento do uso.

Para a amplificação do cDNA foi utilizado o protocolo descrito no item 3.3.2.

Para um controle interno da extração de RNA foi feita a pesquisa de RNA ribossômico 16S com os *primers* 16S1 e 16S2 (Tabela 3) que corresponde a regiões do gene RNAr que são conservadas entre os estafilococos e são específicas do gênero.<sup>108</sup>

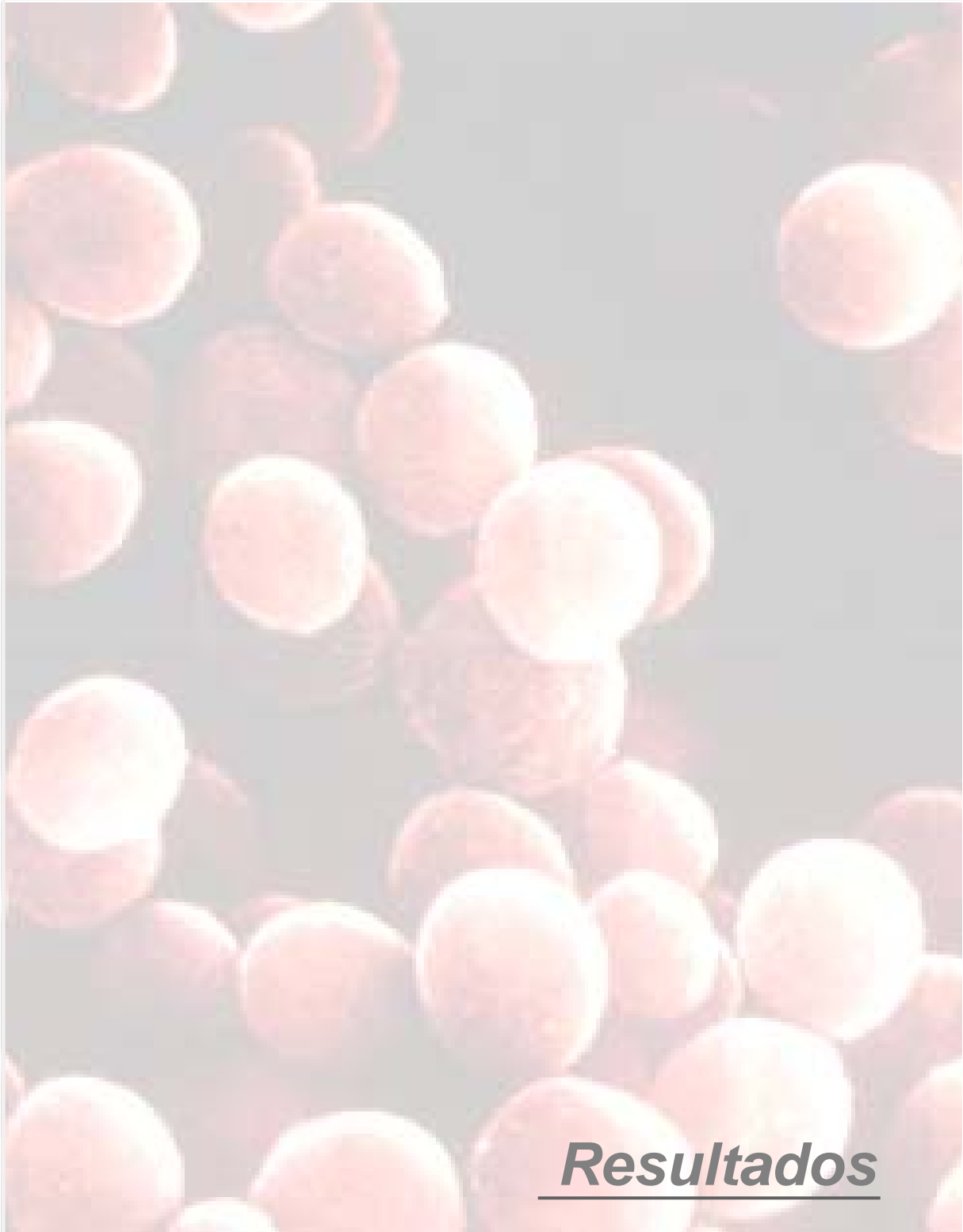
### **3.5 Visualização dos produtos amplificados**

A eficiência das amplificações foi monitorada pela eletroforese da reação em gel de agarose 2% preparado em tampão 1,0 X TBE e corado com Brometo de Etídeo. O tamanho dos produtos amplificados foi comparado com o padrão de 50 e 100 bp e posteriormente fotografados sob transiluminação UV.

### **3. 6 Análise estatística**

Os dados obtidos foram analisados pelo teste  $X^2$  quando não houve valores esperados  $< 5$  e pelo teste de razão de verossimilhança para diferenças de proporções com distribuição aproximada  $X^2$  quando se encontraram valores esperados  $< 5$ . O teste exato de Fisher foi utilizado para tabelas  $2 \times 2$ .

Os resultados da identificação de ECN pelos métodos fenotípico e genotípico foram comparados através do cálculo do coeficiente de correlação de Pearson.



***Resultados***

## 4. Resultados

### 4.1 Microrganismos

Do total de 90 amostras de ECN, 63 amostras foram isoladas a partir de hemoculturas, 22 de corpos estranhos (14 de ponta de cateter, sete de ponta de cânula, uma de dreno torácico) e cinco de secreções. Das 90 amostras de *S. aureus*, 24 foram isoladas de hemoculturas, 40 isoladas de corpos estranhos (21 de ponta de cateter, 11 de ponta de cânula e oito de ponta de dreno torácico) e 26 de secreções (Tabela 4 e 5 e Figuras 1 e 2).

**Tabela 4** - Distribuição das 180 amostras de *Staphylococcus* spp. isoladas de recém nascidos, segundo o material clínico.

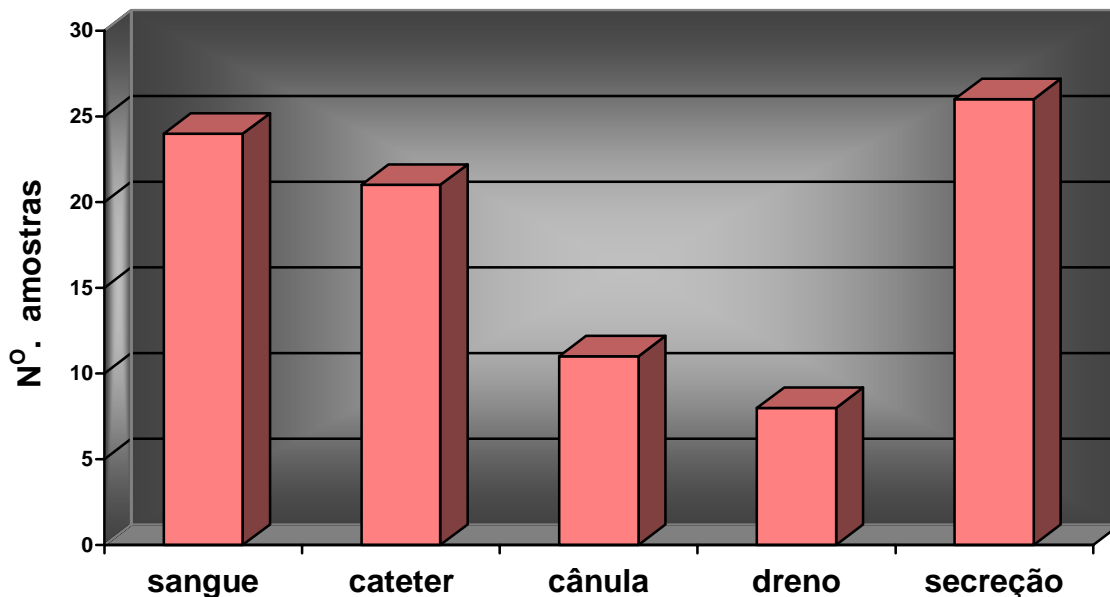
Espécie	Material clínico										Total	
	SNG		CT		CN		PDT		SE		N	%
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%		
<b>S.aureus</b>	24	26,7	21	23,3	11	12,2	8	8,9	26	28,9	90	100
ECN	63	70,0	14	15,6	7	7,8	1	1,1	5	5,5	90	100
Total	87	48,3	35	19,4	18	10,0	9	5,0	31	17,2	180	100

SNG: sangue; CT: ponta de cateter; CN: ponta de cânula; PDT: ponta de dreno torácico; SE: secreção.

**Tabela 5** - Distribuição de 90 amostras de ECN isoladas de recém nascidos, segundo a espécie e o material clínico.

Espécie	Material Clínico					Total	
	SNG	CT	CN	PDT	SE	N	%
<i>S. epidermidis</i>	46	9	4	1	4	64	71,0
<i>S. warneri</i>	3	2	1	0	0	6	6,7
<i>S. haemolyticus</i>	5	0	0	0	0	5	5,6
<i>S. hominis</i>	2	1	2	0	0	5	5,6
<i>S. lugdunensi</i>	4	1	0	0	0	5	5,6
<i>S. simulans</i>	3	0	0	0	0	3	3,3
<i>S. saprophyticus</i>	0	0	0	0	1	1	1,1
<i>S. xylosum</i>	0	1	0	0	0	1	1,1
<b>Total</b>	<b>63</b>	<b>14</b>	<b>7</b>	<b>1</b>	<b>5</b>	<b>90</b>	<b>100,0</b>

SNG: sangue; CT: ponta de cateter; CN: ponta de cânula; PDT: ponta de dreno torácico; SE: secreção.



**Figura 1.** Distribuição de *S. aureus* segundo o material clínico.

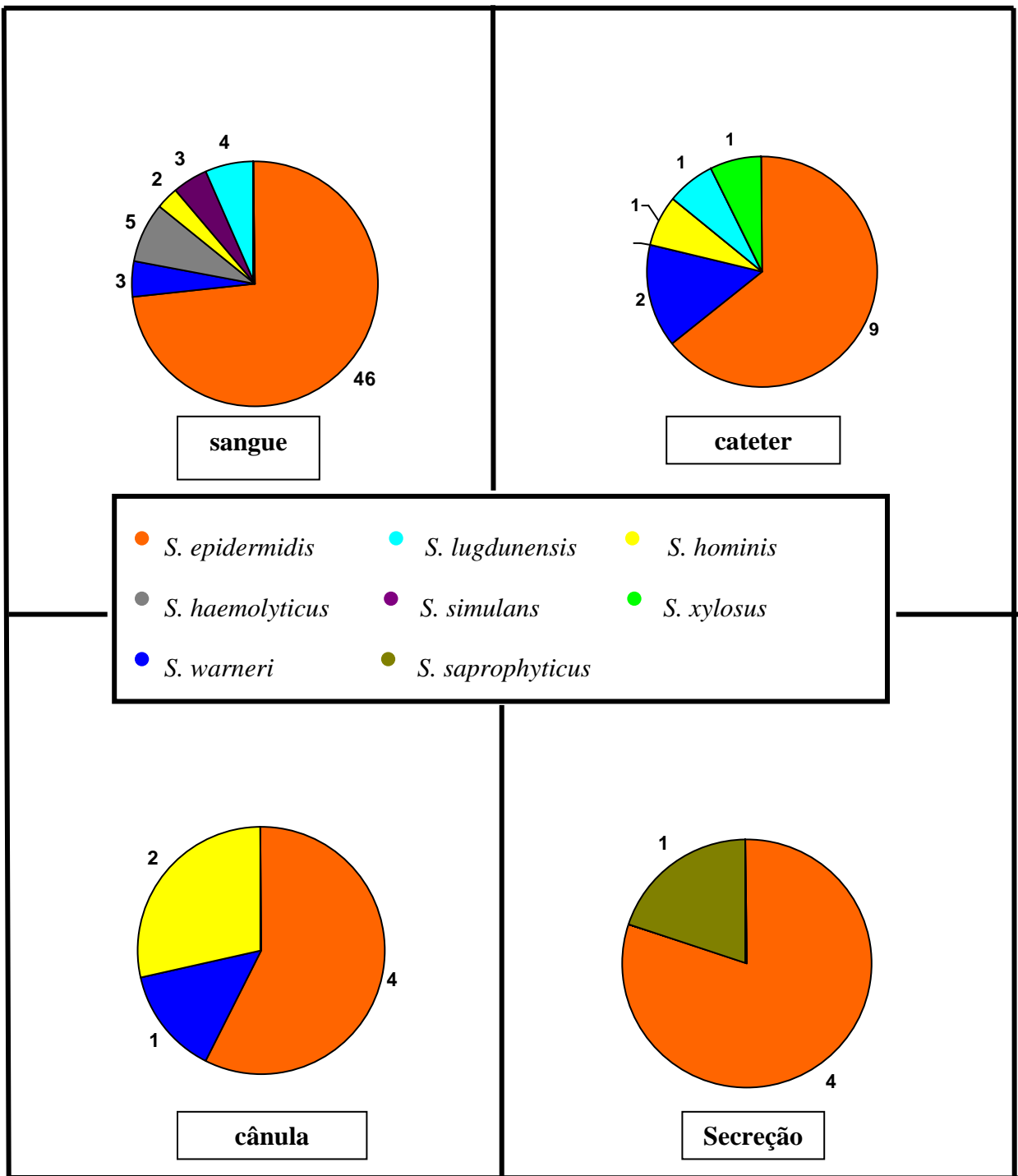
#### **4. 2 Identificação de estafilococos coagulase-negativa**

A identificação fenotípica (Figura 3) ficou assim distribuída, 68 (75,6%) amostras de *S. epidermidis*, cinco (5,6%) amostras de *S. lugdunensis*, duas (2,2%) amostras de *S. warneri*, sete (7,8%) amostras de *S. haemolyticus*, quatro (4,4%) amostras de *S. hominis*, três (3,3%) amostras de *S. simulans* e uma amostra de *S. xylosus*. Além da identificação fenotípica, 60 amostras de ECN também foram submetidas a identificação genotípica pela técnica ITS-PCR incluindo 38 amostras de *S. epidermidis* que foram positivas para a presença de genes que codificam as toxinas estafilocócicas e todas as amostras referentes às outras espécies de ECN identificadas pelo método fenotípico (n=22).

A comparação das duas técnicas para a identificação dessas amostras revelou nove (15,0%) discrepâncias entre os métodos (Figura 4). Com essa nova

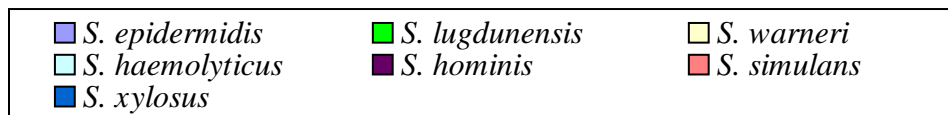
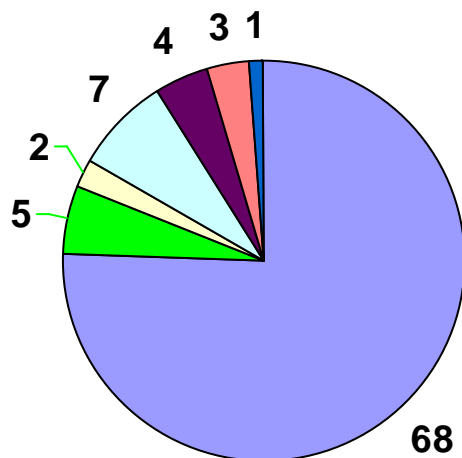
técnica algumas espécies tiveram a sua identificação alterada. Cinco amostras de *S. epidermidis* identificadas por provas bioquímicas não tiveram sua identificação confirmada pela técnica genotípica, sendo três amostras reidentificadas como *S. warneri* e duas como *S. hominis*.

Duas amostras identificadas como *S. haemolyticus* pelo método fenotípico também foram reidentificadas como *S. warneri*, além de uma amostra de *S. hominis* reidentificada como *S. saprophyticus* e uma amostra de *S. warneri* identificada pela técnica ITS-PCR como *S. epidermidis*. A figura 5 mostra uma foto de um gel de poliacrilamida para a identificação de ECN pela técnica ITS-PCR.

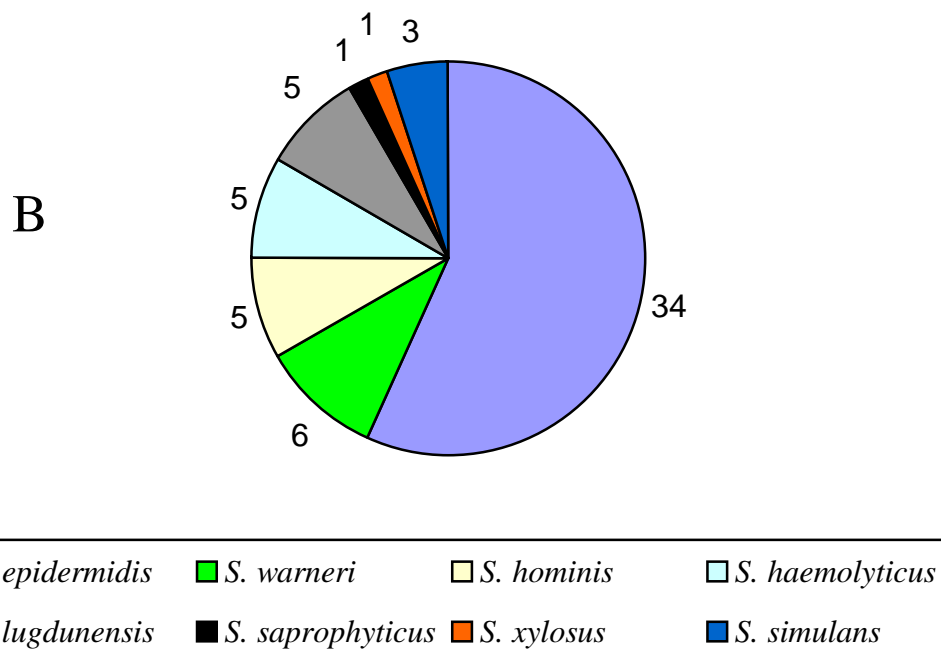
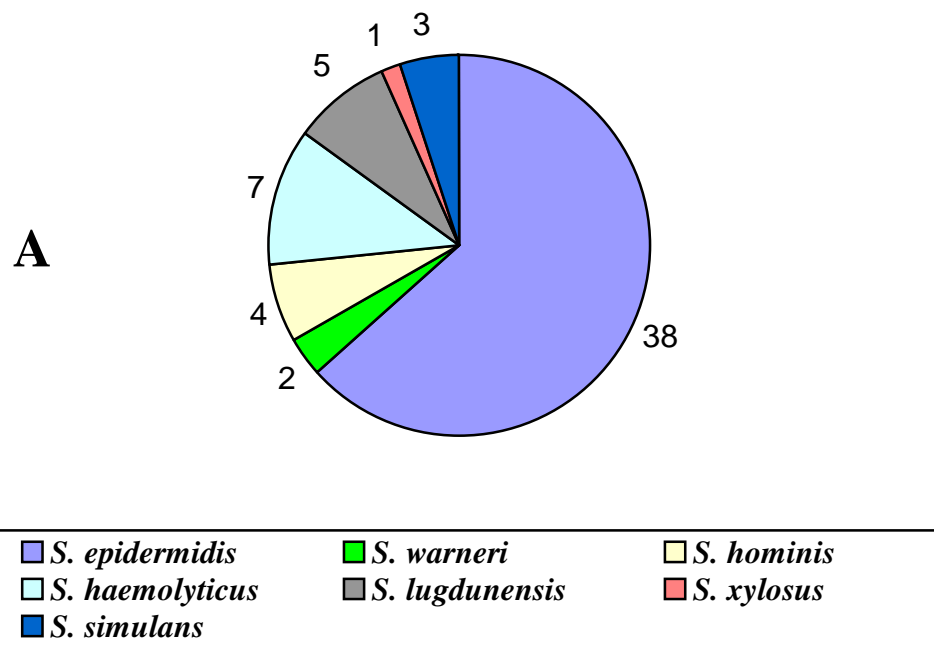


**Figura 2.** Distribuição de espécies de ECN segundo o material clínico.

A identificação final de ECN mostrou que o *S. epidermidis* foi a espécie isolada em 71,0% da população estudada. Os isolados restantes foram distribuídos entre *S.warneri* (6,7%), *S. haemolyticus* (5,6%), *S. hominis* (5,6%), *S. lugdunensis* (5,6%), *S. simulans* (3,3%), *S. saprophyticus* (1,1%) e *S. xylosus* (1,1%) (Tabela 5).



**Figura 3** – Identificação fenotípica de 90 amostras de ECN.



**Figura 4.** Identificação fenotípica (A) e genotípica (B) de espécies de ECN.

### 4.3 Determinação do perfil toxigênico pela técnica de PCR.

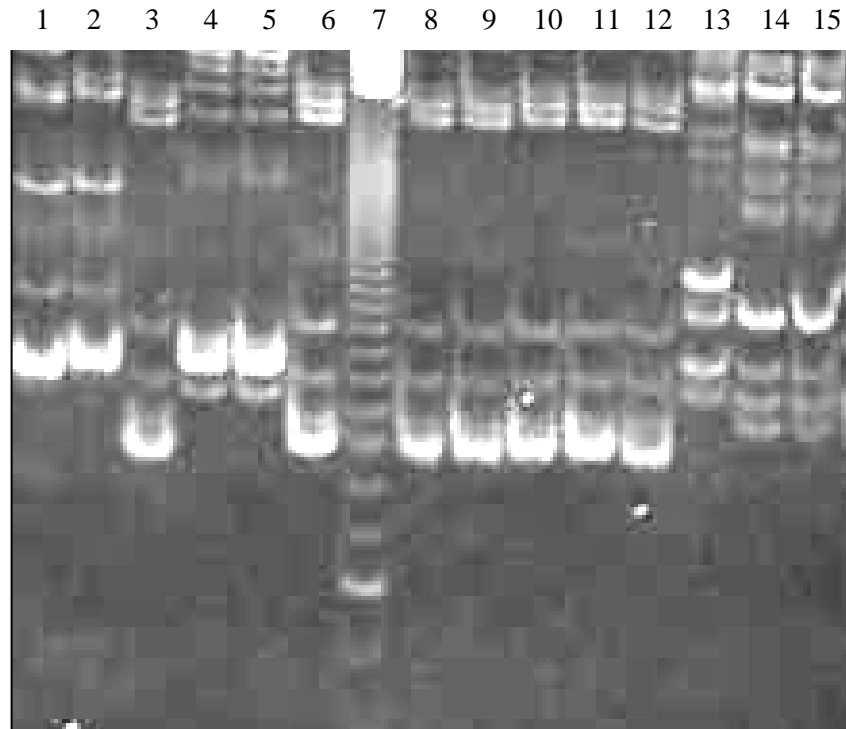
A técnica de PCR utilizada para a detecção dos genes responsáveis pela produção das enterotoxinas A, B, C e D e da TSST-1, evidenciou que das 90 amostras isoladas de *S. aureus*, 59 (65,6%), foram positivas para os genes que codificam as enterotoxinas A, B, C, D e/ou TSST-1, enquanto que das 90 amostras de ECN, 49 (54,4%) foram positivas para a presença de alguns desses genes. Do total de 180 amostras de estafilococos, 108 (60,0%) apresentaram genes responsáveis pela produção das enterotoxinas A, B, C, D ou da TSST-1, conforme figura 6.

A distribuição de amostras de *S. aureus* toxigênicas com relação ao material biológico (sangue, corpo estranho e secreção), conforme tabelas 6 e 7, revelou 13 amostras enterotoxigênicas isoladas de um total de 24 hemoculturas, sendo cinco amostras positivas para o gene *sea*, sete amostras positivas para o gene *sec-1* e uma amostra positiva para os genes *sea + seb*, concomitantemente.

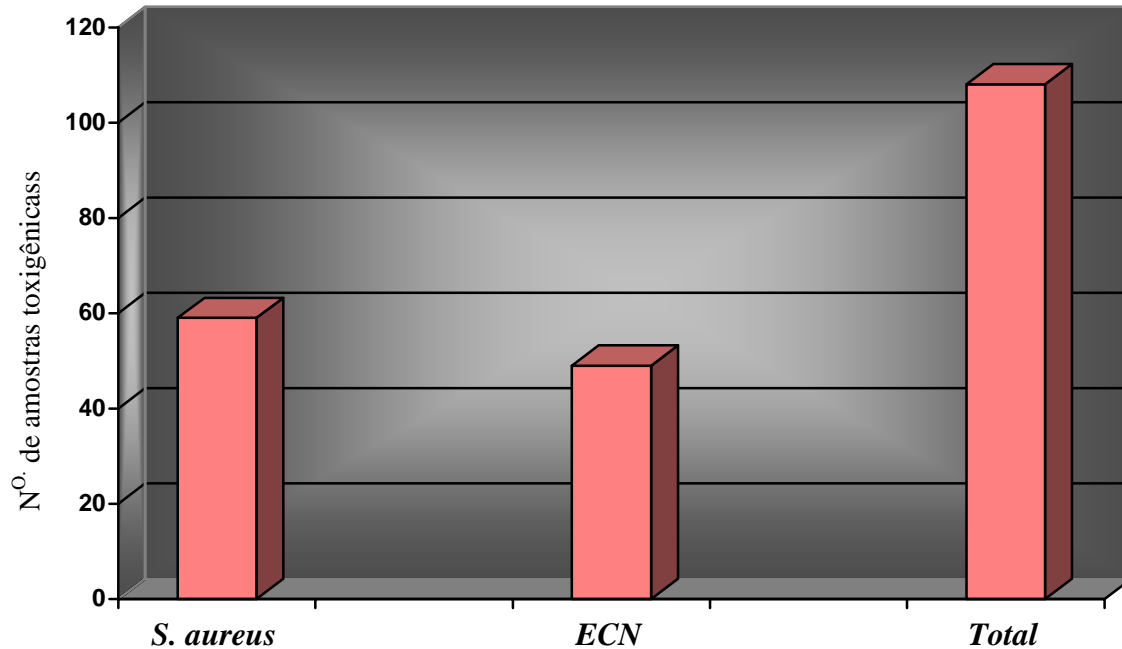
Das 21 amostras isoladas de ponta de cateter, 10 apresentaram-se toxigênicas, sendo que duas foram positivas para o gene *sea*, uma positiva para o gene *seb*, três amostras positivas para o gene *sec-1*, uma para o gene *tst*, e as três últimas apresentaram as associações dos genes *sea + seb*, *sea + sec-1*, e *sec-1 + tst*.

Das 11 amostras isoladas de ponta de cânula, seis apresentaram-se enterotoxigênicas, sendo que 5 possuíam o gene *seb* e uma o gene *sec-1*. Das oito amostras isoladas de ponta de dreno torácico todas apresentaram-se toxigênicas, sendo quatro amostras positivas para o gene *seb*, uma amostra

positiva para o gene *sec-1*, uma amostra positiva para os genes *sea* + *tst* e as duas amostras restantes apresentaram-se positivas para os genes *sec-1* + *tst*.



**Figura 5** – Eletroforese em gel de poliacrilamida para identificação de ECN pela técnica ITS-PCR. 1: amostra de *S. xylosus*, 2: *S. xylosus* ATCC 29979, 3: amostra identificada como *S. warneri* pelo método fenotípico mas com padrão genotípico de *S. epidermidis*, 4: amostra de *S. warneri*, 5: *S. warneri* ATCC 10209, 6: amostra de *S. epidermidis*, 7: marcador de peso molecular (100 bp), 8, 9, 10, 11: amostras de *S. epidermidis*, 12: *S. epidermidis* ATCC 12228, 13: *S. aureus* ATCC 13565, 14, 15: *S. aureus*. ATCC 19095.



**Figura 6.** Derteminação da toxigenicidade em espécies de *Staphylococcus* spp. pela técnica de PCR.

Das 26 amostras isoladas de secreções, 22 amostras foram toxigênicas, correspondendo a quatro positivas para o gene *sea*, duas para o gene *seb*, oito para o gene *sec-1*, uma para o gene *sed*, três para o gene *tst*, duas para os genes *sea + seb* e duas para os genes *sea + sec-1*.

Em relação as amostras de ECN toxigênicas, conforme tabelas 6 e 8, pôde-se observar que do total de 64 hemoculturas, foram isolados 36 estafilococos toxigênicos, sendo quatro amostras positivas para o gene *sea*, 19 amostras positivas para o gene *sec-1*, cinco amostras positivas para o gene *tst*, três amostras positivas para os genes *sea + sec-1*, quatro amostras positivas para os genes *sec-1 + tst*, e uma amostra positiva para os genes *sea + sec-1 + tst*. Das 14 amostras isoladas de ponta de cateter, oito apresentaram-se toxigênicas,

sendo duas amostras positivas para o gene *sea*, uma para o gene *seb*, três amostras positivas para o gene *sec-1*, e uma amostra positiva para cada das associações *sea + tst* e *sec-1 + tst*.

**Tabela 6** – Distribuição de amostras de *Staphylococcus* spp. toxigênicas segundo o material clínico.

	Genes de Toxinas – PCR				
	<i>S. aureus</i> (n=90) N/Total* (%)	<i>S. epidermidis</i> (n=64) N/Total (%)	Outros (n=26) N/Total (%)	Total (n=180) N/Total (%)	
Sangue	13/24 (54,2)	27/46 (58,7)	9/17 (52,9)	49/87	56,3
Cateter	10/21 (47,6)	4/9	4/5	18/35	51,4
Cânula	6/11	0/4	2/3	8/18	44,4
Dreno	8/8	1/1	0/0	9/9	100,0
Secreção	22/26 (84,6)	1/4	1/1	24/31	77,4
<b>Total</b>	<b>9/90 (65,6)</b>	<b>33/64 (51,6)</b>	<b>16/26 (61,5)</b>	<b>108/180</b>	<b>60,0</b>

\* N/Total: N° amostras toxigênicas/Total de amostras.

Das sete amostras isoladas de ponta de cânula, duas apresentaram-se toxigênicas sendo uma para o gene *sea* e a outra para o gene *sec-1*. A única amostra isolada de ponta de dreno torácico, apresentou-se toxigênica para os genes *sec-1 + tst*, enquanto que das cinco secreções isoladas, duas apresentaram-se toxigênicas para o gene *sea*.

**Tabela 7** – Distribuição de genes de toxinas segundo o material clínico em amostras de *S. aureus*.

Genes de toxinas PCR	Material Clínico					Total
	SNG	CT	CN	PDT	SEC	
<i>sea</i>	5	2	0	0	4	11
<i>seb</i>	0	1	5	4	2	12
<i>sec-1</i>	7	3	1	1	8	20
<i>sed</i>	0	0	0	0	1	1
<i>tst</i>	0	1	0	0	3	4
<i>sea+seb</i> *	1	1	0	0	2	4
<i>sea+sec-1</i> **	0	1	0	0	2	3
<i>sea+tst</i> ***	0	0	0	1	0	1
<i>sec-1+tst</i> ****	0	1	0	2	0	3
<b>Total</b>	<b>13</b>	<b>10</b>	<b>6</b>	<b>8</b>	<b>22</b>	<b>59</b>

SNG: sangue; CT: ponta de cateter; CN: ponta de cânula; PDT: ponta de dreno torácico; SEC: secreção.

*sea*: gene da enterotoxina A; *seb*: gene da enterotoxina B; *sec-1*: gene da enterotoxina C; *sed*: gene da enterotoxina D; *tst*: gene da toxina 1 da síndrome do choque tóxico.

\*: Presença concomitante dos genes das enterotoxinas A e B.

\*\* : Presença concomitante dos genes das enterotoxinas A e C.

\*\*\* : Presença concomitante dos genes das enterotoxinas A e TSST-1.

\*\*\*\* : Presença concomitante dos genes das enterotoxinas C e TSST-1..

Conforme ilustrado na tabela 7 e figura 7, pôde-se observar que o gene *sec-1* foi o mais detectado em amostras de *S. aureus*, sendo encontrado em 26 (44,1%) das amostras toxigênicas, o qual foi detectado sozinho ou associado a outros genes de toxinas. O gene *sea* ocorreu em 19 (32,2%) das amostras toxigênicas, o gene *seb* apareceu em 16 (27,1%) e o gene *tst* em 8 (13,56%) das amostras toxigênicas.

Das 49 amostras toxigênicas de ECN, o gene *sec-1* também foi o mais prevalente, encontrado em 33 (67,4%) das amostras testadas, enquanto que o gene *sea* foi encontrado em 14 (28,6%) das amostras toxigênicas, o gene *seb* em

apenas uma amostra e o gene *tst* em 13 amostras correspondendo a 26,5% (tabela 8 e figura 8).

A análise da presença dos diferentes genes de toxinas em espécies de *S. aureus* quando comparada às espécies de *S. epidermidis* e outros ECN revelou a presença do gene *seb* principalmente em *S. aureus*, com diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,00020$ ) conforme tabela 9.

Quando avaliamos as espécies de ECN com relação a toxigenicidade, podemos observar que das 64 amostras isoladas de *S. epidermidis*, 33 (51,6%) apresentaram-se positivas. Das seis amostras de *S. warneri* investigadas, todas apresentaram genes toxigênicos, enquanto que para a espécie *S. hominis*, das cinco amostras avaliadas, três apresentaram-se toxigênicas. O mesmo ocorreu para as cinco amostras de *S. lugdunensis* com três amostras toxigênicas. Das cinco amostras de *S. haemolyticus* isoladas, duas foram positivas para a presença de genes toxigênicos. As espécies *S. saprophyticus* e *S. xylosus* com uma amostra cada, também apresentaram-se toxigênicas. Por outro lado, as três amostras de *S. simulans* não apresentaram os genes pesquisados.

**Tabela 8** – Distribuição de genes de toxinas segundo o material clínico em amostras de ECN.

Genes de toxinas PCR	Material Clínico					Total
	SNG	CT	CN	PDT	SEC	
<i>sea</i>	4	2	1	0	2	9
<i>seb</i>	0	1	0	0	0	1
<i>sec-1</i>	19	3	1	0	0	23
<i>tst</i>	5	0	0	0	0	5
<i>sea+sec-1</i> <sup>*</sup>	3	0	0	0	0	3
<i>sea+tst</i> <sup>**</sup>	0	1	0	0	0	1
<i>sec-1+tst</i> <sup>***</sup>	4	1	0	1	0	6
<i>sea+sec+tst</i> <sup>****</sup>	1	0	0	0	0	1
<b>Total</b>	<b>36</b>	<b>8</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>49</b>

SNG: sangue; CT: ponta de cateter; CN: ponta de cânula; PDT: ponta de dreno torácico; SEC: secreção.

*sea*: gene da enterotoxina A; *seb*: gene da enterotoxina B; *sec-1*: gene da enterotoxina C; *sed*: gene da enterotoxina D; *tst*: gene da toxina 1 da síndrome do choque tóxico.

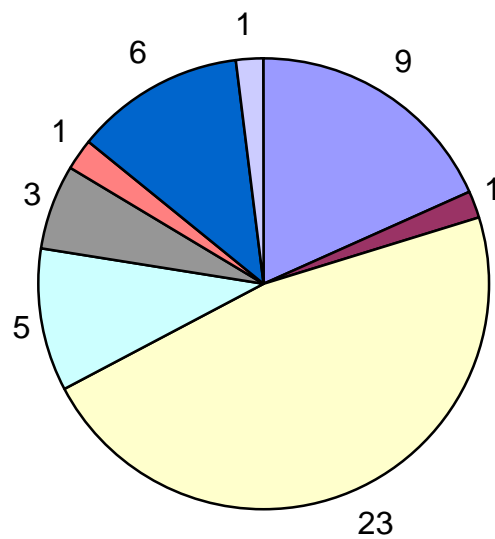
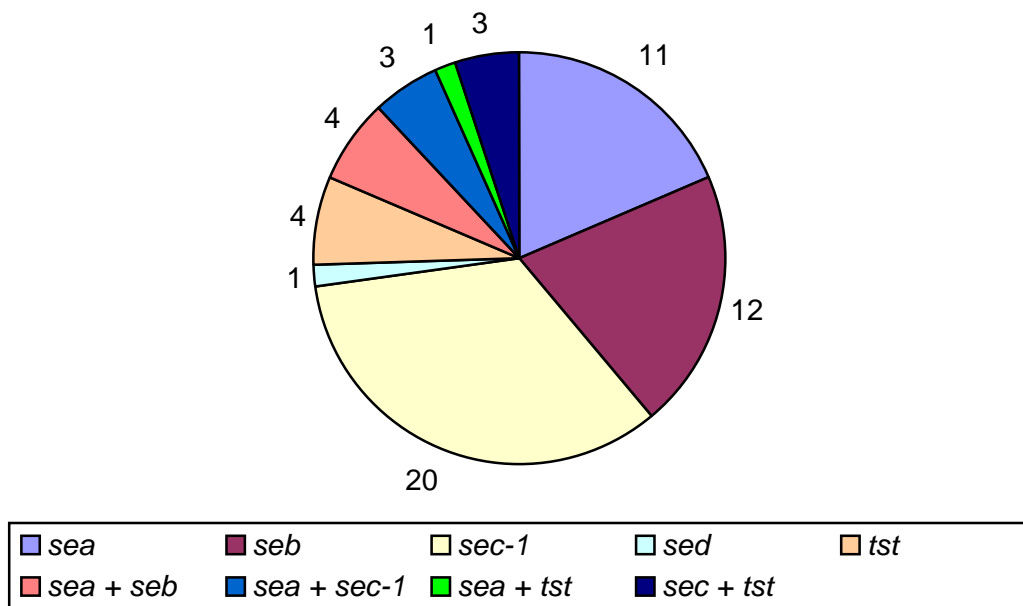
\*: Presença concomitante dos genes das enterotoxinas A e C.

\*\* : Presença concomitante dos genes das enterotoxinas A e TSST-1.

\*\*\* : Presença concomitante dos genes das enterotoxinas C e TSST-1.

\*\*\*\* : Presença concomitante dos genes das enterotoxinas A, C e TSST-1.

A tabela 10 apresenta a análise estatística dos diferentes tipos de genes em relação ao material clínico, sendo que a presença de *seb* foi verificada principalmente em corpo estranho e secreção ( $p < 0,0001$ ), enquanto a presença de *sec-1 + tst* foi mais freqüente em sangue e corpo estranho ( $p = 0,0069$ ).



**Figura 7.** Determinação do perfil toxigênico em *S. aureus* pela técnica de PCR.

**Tabela 9** – Perfil toxigênico dos estafilococos isolados de recém-nascidos pela técnica PCR.

Genes de toxinas PCR	Espécies			Total	valor <i>p</i>
	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	Outros		
<i>sea</i>	11	5	4	20	0,5683
<i>seb</i>	12	1	0	13	0,0020
<i>sec-1</i>	20	15	8	43	0,7308
<i>sed</i>	1	0	0	1	0,4986
<i>tst</i>	4	5	0	9	0,1489
<i>sea+seb</i> *	4	0	0	4	0,0597
<i>sea+sec-1</i> **	3	2	1	6	0,9920
<i>sea+tst</i> ***	1	0	1	2	0,2961
<i>sec-1+tst</i> ****	3	4	2	9	0,5754
<i>sea+sec-1+tst</i> *****	0	1	0	1	0,3482
<b>Total</b>	<b>59</b>	<b>33</b>	<b>16</b>	<b>108</b>	<b>0,3052</b>

*sea*: gene da enterotoxina A; *seb*: gene da enterotoxina B; *sec-1*: gene da enterotoxina C; *sed*: gene da enterotoxina D; *tst*: gene da toxina 1 da síndrome do choque tóxico.

\*: Presença concomitante dos genes das enterotoxinas A e B.

\*\* : Presença concomitante dos genes das enterotoxinas A e C.

\*\*\* : Presença concomitante dos genes das enterotoxinas A e TSST-1.

\*\*\*\* : Presença concomitante dos genes das enterotoxinas C e TSST-1.

\*\*\*\*\* : Presença concomitante dos genes das enterotoxinas A , C e TSST-1.

**Tabela 10**– Distribuição de genes de toxinas segundo o material biológico.

Genes de toxinas PCR	Material Clínico					Total	valor p
	SNG	CT	CN	PDT	SEC		
<i>sea</i>	9	4	1	0	6	20	0,4890
<i>seb</i>	0	2	5	4	2	13	< 0,0001
<i>sec-I</i>	26	6	2	1	8	43	0,3042
<i>sed</i>	0	0	0	0	1	1	0,3250
<i>tst</i>	5	1	0	0	3	9	0,3797
<i>sea+seb</i> <sup>*</sup>	1	1	0	0	2	4	0,4934
<i>sea+sec-I</i> <sup>**</sup>	3	1	0	0	2	6	0,6503
<i>sea+tst</i> <sup>***</sup>	0	1	0	1	0	2	0,4067
<i>sec-I+tst</i> <sup>****</sup>	4	2	0	3	0	9	0,0069
<i>sea+sec-I+tst</i> <sup>*****</sup>	1	0	0	0	0	1	0,8337
<b>Total</b>	<b>49</b>	<b>18</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>24</b>	<b>108</b>	

*sea*: gene da enterotoxina A; *seb*: gene da enterotoxina B; *sec-I*: gene da enterotoxina C; *sed*: gene da enterotoxina D; *tst*: gene da toxina 1 da síndrome do choque tóxico. SNG: sangue; CT: ponta de cateter; CN: ponta de cânula; PDT: ponta de dreno torácico; SEC: secreção.

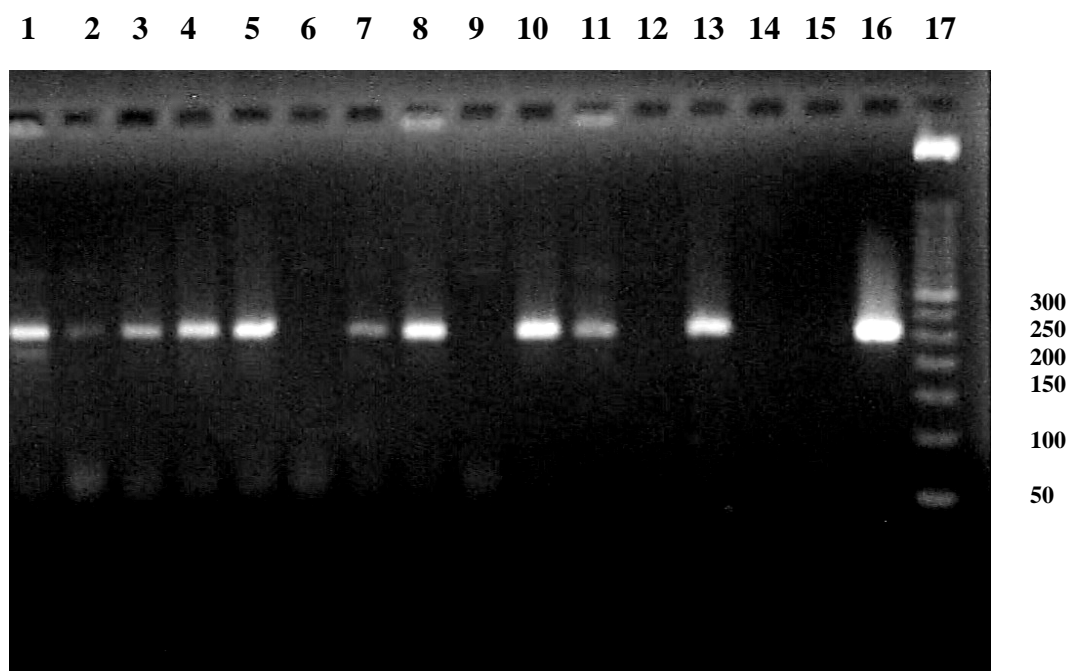
<sup>\*</sup>: Presença concomitante dos genes das enterotoxinas A e B.

<sup>\*\*</sup>: Presença concomitante dos genes das enterotoxinas A e C.

<sup>\*\*\*</sup>: Presença concomitante dos genes das enterotoxinas A e TSST-1.

<sup>\*\*\*\*</sup>: Presença concomitante dos genes das enterotoxinas C e TSST-1.

<sup>\*\*\*\*\*</sup>: Presença concomitante dos genes das enterotoxinas A, C e TSST-1.

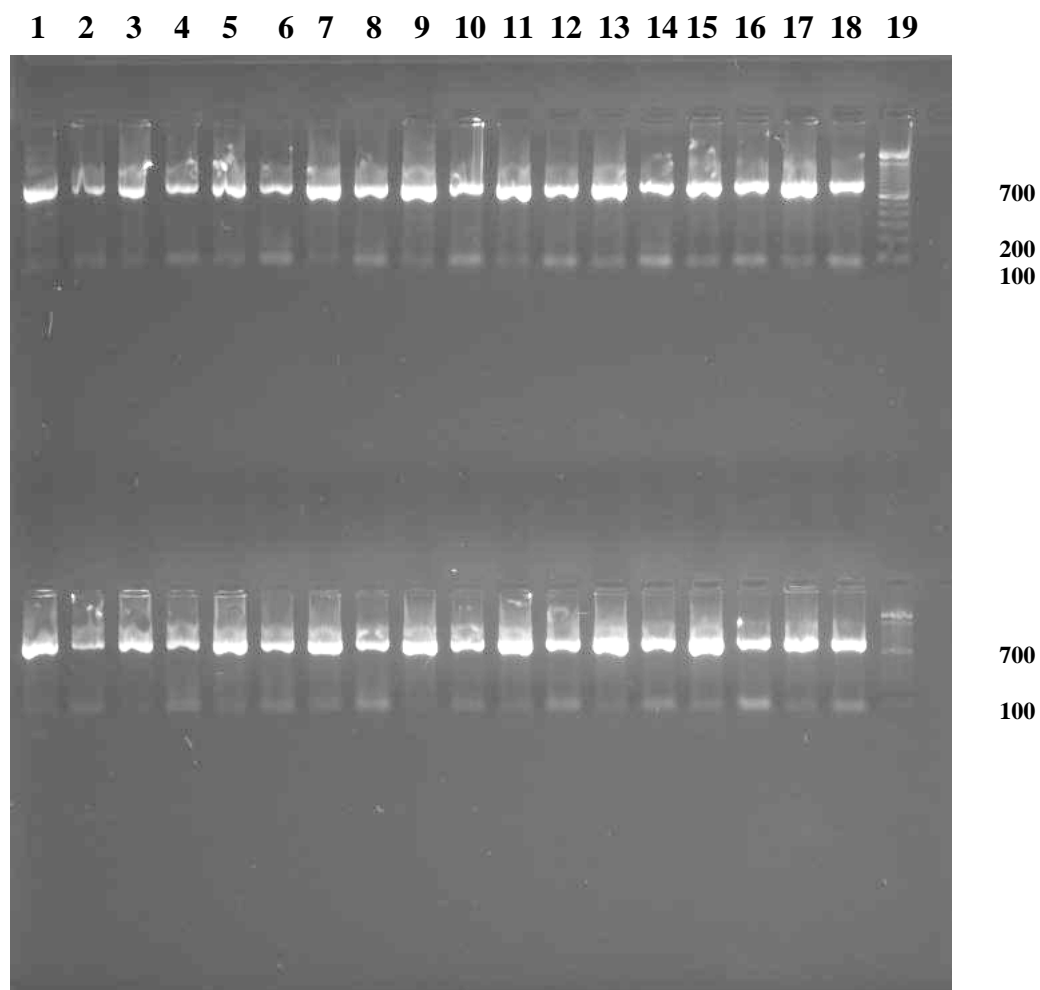


**Figura 9** – Eletroforese em gel de agarose para pesquisa do gene *sec-1* (257 bp) em amostras de ECN pela técnica de PCR. 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 10, 11, 13: amostras positivas, 6, 9, 12, 14: amostras negativas, 15: controle negativo, 16: *S. aureus* ATCC 19095 e 17: marcador de peso molecular (50 bp).

#### 4.4 Determinação do perfil toxigênico pela técnica de RT-PCR.

As amostras de *S. aureus* (n=59) e ECN (n=49) as quais apresentaram-se toxigênicas pela técnica de PCR, foram submetidas à extração de RNA conforme item 3.4.1 para investigação da expressão de toxinas pela técnica RT-PCR. O controle interno de extração do RNA através da pesquisa de RNA ribossômico 16S mostrou resultado positivo para todas as amostras (Figura 10).

Das 108 amostras toxigênicas pela técnica de PCR, 43 (39,8%) apresentaram-se positivas para a expressão da toxina quando submetidas a técnica de RT-PCR (Tabela 11, Figuras 11 e 12). Sua expressão correspondeu a 37 (34,3%) de amostras de *S. aureus* e 6 (5,6%) de amostras de ECN. As amostras de *S. aureus* expressaram RNAm para todas as classes de toxinas testadas EEA, EEB, EEC, EED e TSST-1, enquanto que as amostras de ECN expressaram RNAm de EEA e EEC. Das 16 amostras de *S. aureus* que apresentaram genes toxigênicos para a EEB, 13 confirmaram a sua expressão pela técnica RT-PCR, correspondendo a 81,3% do total de *S. aureus* com genes para essa toxina. Também foi confirmada a expressão de EEA em 12 (63,2%) das 19 amostras com o gene *sea*. Para a EEC foi observada sua expressão em 13 (50,0%) das 26 amostras que apresentaram o gene *sec-1*, e a TSST-1 foi encontrada em três das oito amostras que apresentaram o gene responsável pela sua produção. A única amostra que apresentou o gene da EED confirmou a sua expressão quando avaliada pela técnica RT-PCR (Tabelas 12 e 13).



**Figura 10** – Eletroforese em gel de agarose para pesquisa do rRNA 16 S (791 bp) em amostras de *Staphylococcus* spp. pela técnica de RT-PCR. 1 a 18: amostras positivas.

Das 14 amostras de ECN que apresentaram genes para a EEA, três confirmaram a expressão dessa toxina, enquanto que das 33 amostras com genes para a EEC pelo PCR, apenas três confirmaram a sua expressão. Nenhuma das treze amostras que apresentaram genes para a TSST-1 apresentou expressão da toxina quando investigada pela técnica RT-PCR (Tabela 12 e 13).

A expressão de toxinas estafilocócicas por *S. aureus* isolados de diferentes materiais clínicos, revelou a expressão de EEB principalmente por amostras isoladas de corpo estranho (cateter, cânula e ponta de dreno torácico) e secreção ( $p < 0,0001$ ) (Tabela 14).

**Tabela 11** - Distribuição de estafilococos isolados de recém-nascidos, segundo a toxigenicidade das amostras pelo método de PCR e RT-PCR

	Espécies					
	<i>S. aureus</i>		ECN		Total	
	N	%	N	%	N	%
PCR	59	65,5	49	54,4	180	60,0
RT-PCR	37	34,3	6	5,6	108	39,8

A comparação de amostras de *S. aureus* positivas para a expressão de toxinas (n=37) com amostras de ECN (n=6) revelou diferença estatisticamente significativa em relação ao total de amostras toxigênicas ( $p < 0,001$ ) (Tabela 12).

**Tabela 12** – Determinação do perfil toxigênico em *Staphylococcus* spp. pela técnica de RT-PCR.

Toxinas	Espécies			Total	valor p
	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	Outros		
EEA	9	3	0	12	0,0627
EEB	11	0	0	11	0,0003
EEC	10	2	1	13	0,1173
EED	1	0	0	1	0,4986
TSST-1	1	0	0	1	0,4986
EEA+EEB	2	0	0	2	0,2472
EEA+EEC	1	0	0	1	0,4986
EEC+TSST-1	2	0	0	2	0,2472
<b>Total</b>	<b>37</b>	<b>5</b>	<b>1</b>	<b>43</b>	<b>&lt;0,001</b>

EEA: enterotoxina A; EEB: enterotoxina B; EEC: enterotoxina C; EED: enterotoxina D;  
 TSST-1: Toxina 1 da síndrome do choque tóxico

**Tabela 13**– Comparação das técnicas PCR e RT-PCR em amostras de *S. aureus* e ECN.

Genes de toxinas/	PCR		RT-PCR	
	<i>S. aureus</i>	ECN	<i>S. aureus</i>	ECN
enterotoxinas				
<i>sea</i> / EEA	11	9	9	3
<i>seb</i> / EEB	12	1	11	0
<i>sec-I</i> /EEC	20	23	10	3
<i>sed</i> / EED	1	0	1	0
<i>tst</i> /TSST-1	4	5	1	0
<i>sea+seb</i> <sup>*</sup>	4	0	2	0
<i>sea+sec-I</i> <sup>**</sup>	3	3	1	0
<i>sea+tst</i> <sup>***</sup>	1	1	0	0
<i>sec-I+tst</i> <sup>****</sup>	3	6	2	0
<i>sea+sec-I+tst</i> <sup>*****</sup>	0	1	0	0
Total	59	49	37	6

*sea*: gene da enterotoxina A; *seb*: gene da enterotoxina B; *sec-I*: gene da enterotoxina C; *sed*: gene da enterotoxina D; *tst*: gene da toxina 1 da síndrome do choque tóxico.

\*: Presença concomitante dos genes das enterotoxinas A e B.

\*\* : Presença concomitante dos genes das enterotoxinas A e C.

\*\*\* : Presença concomitante dos genes das enterotoxinas A e TSST-1.

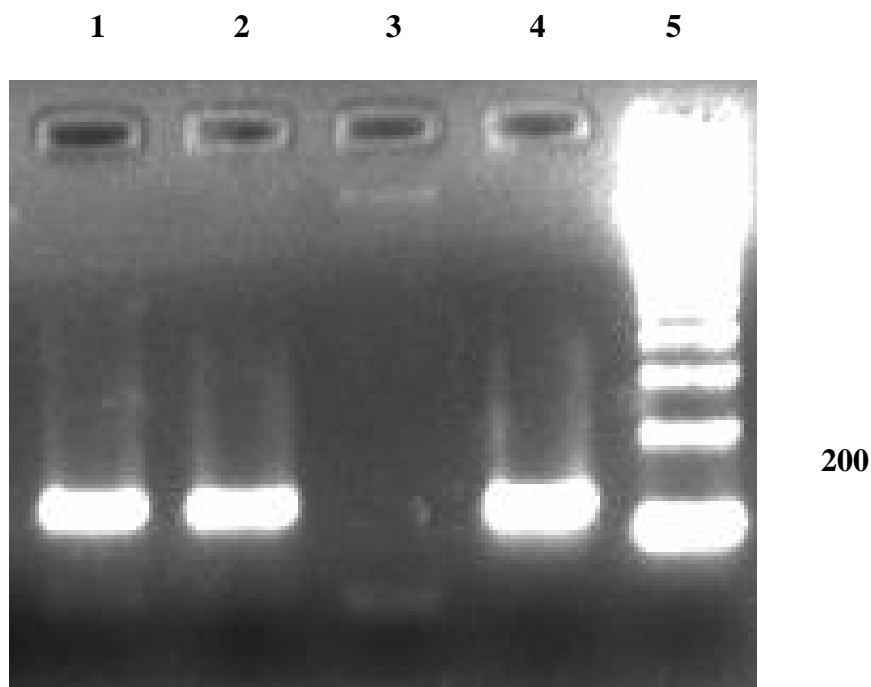
\*\*\*\* : Presença concomitante dos genes das enterotoxinas C e TSST-1.

\*\*\*\*\* : Presença concomitante dos genes das enterotoxinas A , C e TSST-1.

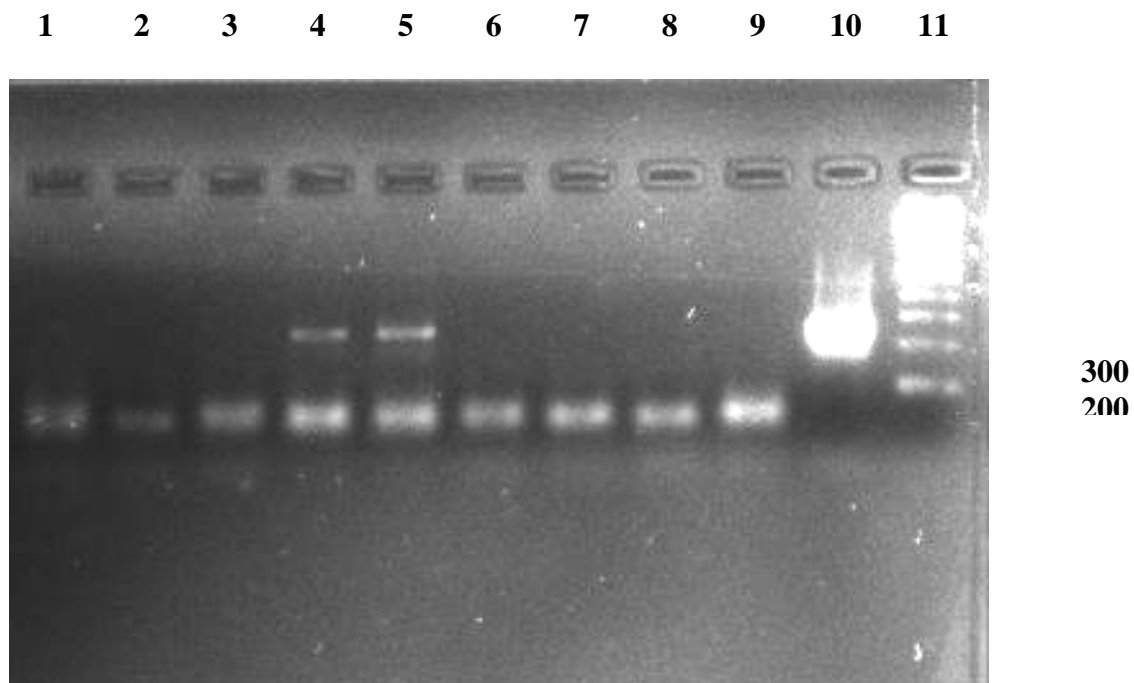
**Tabela 14** – Distribuição da expressão de toxinas por amostras de *Staphylococcus* spp. segundo o material clínico.

Toxinas RT- PCR	Material Clínico						valor p
	SNG	CT	CN	PDT	SEC	Total	
EEA	6	1	0	0	2	9	0,2181
EEB	0	1	4	4	2	11	< 0,0001
EEC	3	2	1	0	4	10	0,7226
EED	0	0	0	0	1	1	0,4809
TSST-1	0	0	0	0	1	1	0,4809
EEA + EEB	1*	1	0	0	1	3	0,4067
EEA + EEC	0	0	0	0	2****	2	0,4809
EEC + TSST-1	2**	1	0	2***	0	5	0,5092
EEA + EEC + TSST-1	1	0	0	0	0	1	0,4809
<b>Total</b>	<b>12</b>	<b>6</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>13</b>	<b>43</b>	

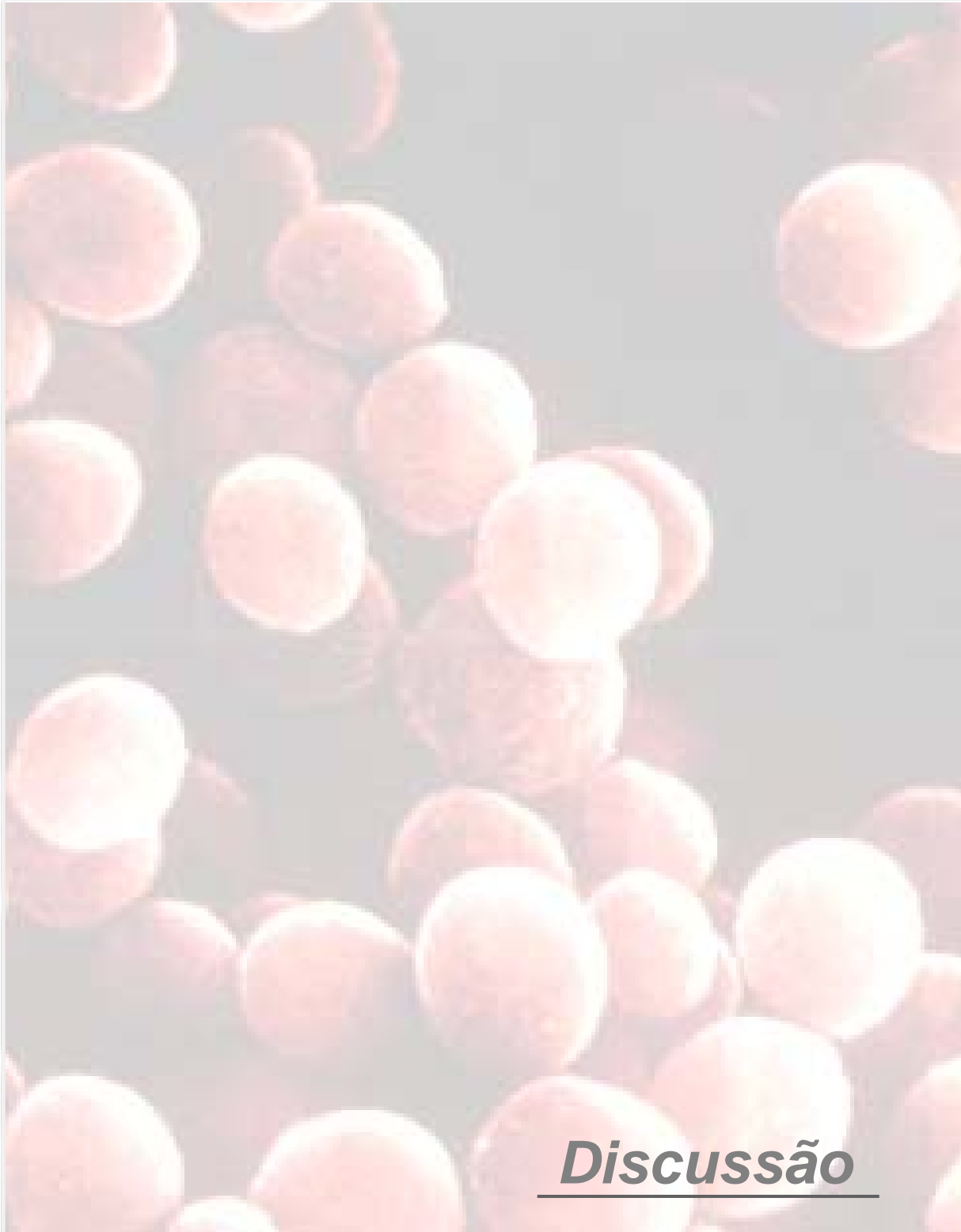
SNG: sangue; CT: ponta de cateter; CN: ponta de cânula; PDT: ponta de dreno torácico; SE: secreção. EEA: enterotoxina A; EEB: enterotoxina B; EEC: enterotoxina C; EED: enterotoxina D; TSST-1: Toxina 1 da síndrome do choque tóxico; \* amostra produtora apenas de EEA; \*\* amostra produtora apenas de EEC; \*\*\* uma das amostras produtoras apenas de EEC; \*\*\*\* uma das amostras produtora apenas de EEA.



**Figura 11** - Eletroforese em gel de agarose para pesquisa da EEA (120 bp) em amostras de *S. aureus* pela técnica de RT-PCR. 1: amostra produtora de EEA, sem tratamento do RNA com DNase; 2: amostra produtora de EEA, tratada previamente com DNase antes da obtenção do cDNA; 3: RNA sem obtenção do cDNA (controle da enzima), 4: *S. aureus* ATCC 13565, 5: marcador de peso molecular (100bp).



**Figura 12** - Eletroforese em gel de agarose para pesquisa da EEC (257 bp) em ECN pela técnica de RT-PCR. 1, 2, 3: amostras negativas, 4: amostra produtora de EEA, sem tratamento do RNA com DNase; 5: amostra produtora de EEA, tratada previamente com DNase antes da obtenção do cDNA, 6: RNA da mesma amostra sem obtenção do cDNA, 7, 8, 9: amostras negativas para EEA, 10: *S. aureus* ATCC 19095, 11: marcador de peso molecular (100bp).



**Discussão**

## 5. DISCUSSÃO

Os *Staphylococcus* são microrganismos freqüentemente encontrados no ambiente hospitalar, estando associados a uma grande variedade de infecções. Diversos fatores de virulência são responsáveis pela patogenicidade dos estafilococos, destacando-se entre eles as toxinas superantigênicas, enterotoxinas e a toxina TSST-1.

Dentre as espécies toxigênicas, a espécie *S. aureus* é a mais conhecida e bem descrita na literatura,<sup>40,109,110</sup> porém alguns estudos relatam também a produção de toxinas pelos ECN.<sup>56,58,60,61,111</sup>

Nesse estudo foi avaliado o potencial toxigênico de 90 amostras de *S. aureus* e 90 amostras de ECN, com a detecção de genes que codificam as enterotoxinas estafilocócicas e TSST-1 pela técnica de PCR, e a capacidade dessas amostras expressarem esses genes pelo método de RT-PCR. As amostras foram submetidas à identificação fenotípica e para todas as amostras de ECN que apresentaram genes toxigênicos foi realizada uma identificação genotípica para confirmação da espécie utilizando a técnica ITS-PCR. A comparação dos resultados da identificação das espécies mostrou uma boa correlação entre os métodos. A identificação revelou a espécie *S. epidermidis* como a mais freqüente, correspondendo a 64(71,0%) das 90 amostras de ECN investigadas, além de amostras de *S. warneri*, *S. haemolyticus*, *S. lugdunensis*, *S. hominis*, *S. simulans*, *S. xylosus* e *S. saprophyticus*. Esses resultados são semelhantes aos descritos por Udo et al.<sup>60</sup> e Kloos & Bannerman<sup>7</sup>, que também encontraram uma freqüência maior de *S. epidermidis*.

Do total das 180 amostras estudadas, 108 (60,0%) foram positivas quando investigadas pela técnica de PCR para a detecção de genes que codificam as toxinas estafilocócicas, sendo que 59 (54,6%) corresponderam a amostras de *S. aureus* e 49 (45,4%) a amostras de ECN. O estudo do perfil toxigênico de ECN revelou 54,4% de amostras com um ou mais genes das 90 amostras isoladas, sendo a espécie *S. epidermidis* a que apresentou o maior potencial toxigênico. Das 64 amostras investigadas de *S. epidermidis*, 51,6% apresentaram genes para as toxinas A (*sea*), C (*sec-1*) e TSST-1 (*tst*), isolados ou associados. Entretanto, outras espécies de ECN isoladas também foram positivas pela técnica de PCR. Dentre elas destaca-se o *S. warneri*, onde todas as seis amostras isoladas apresentaram-se toxigênicas para os genes *sea* e/ou *sec-1*. Três amostras de *S. lugdunensis* apresentaram os genes *sec-1*, sendo que uma delas também apresentou o gene *tst* associado. Três amostras de *S. hominis*, duas de *S. haemolyticus* e uma amostra de *S. saprophyticus* e *S. xylosus* também apresentaram os genes *sea*, *sec-1* e/ou *tst*. A única espécie que não apresentou amostras com genes toxigênicos foi o *S. simulans* com três amostras negativas.

Diversos fatores do meio e sistemas regulatórios presentes nos microrganismos podem afetar diretamente a produção de toxinas. Dessa forma, a presença de genes toxigênicos nas amostras de estafilococos não exclui a possibilidade de produção de toxinas em determinado momento, seja a produção *in vivo* ou em meios de cultura com condições ótimas.

Alguns autores também relatam a presença de genes toxigênicos em ECN, como em estudo realizado por Cunha et al.<sup>77</sup> no qual descrevem a presença de ECN enterotoxigênicos isolados de alimentos. Das vinte amostras de ECN

isoladas, três apresentaram o gene *sea* e uma amostra apresentou o gene *sec-1*. O gene *sea* foi detectado em uma amostra de *S. epidermidis*, em uma amostra de *S. xylosus* e em uma de *S. hominis*, enquanto que o gene *sec-1* foi detectado em uma amostra de *S. xylosus*. Schmitz et al.<sup>100</sup> ao avaliarem amostras de ECN quanto a presença de genes toxigênicos também encontraram duas amostras positivas para o gene *sec-1* de um total de 50 amostras investigadas. Entretanto, outros autores não obtiveram resultados positivos para a presença de genes toxigênicos em amostras de ECN de isolados clínicos, como em estudo realizado por Becker et al.<sup>97</sup> utilizando a técnica PCR multiplex. Kreiswirth & Novick<sup>112</sup> utilizando a técnica de hibridização de DNA avaliaram várias espécies de ECN quanto a presença de genes responsáveis pela expressão de TSST-1. Esses autores incluíram no estudo algumas amostras relatadas por Crass & Bergdoll<sup>74</sup> como amostras produtoras de TSST-1. Em nenhuma das amostras de ECN foi confirmada a presença do gene *tst*, além de duas amostras TSST-1 positivas, identificadas anteriormente como ECN, apresentarem-se coagulase positivas, indicando um erro de identificação.

Outros autores também questionam a capacidade dos ECN serem produtores de enterotoxinas e TSST-1 e sugerem que essas amostras possam ser *S. aureus* mutantes os quais não expressam a enzima coagulase.<sup>102,103,113</sup> Com o intuito de descartar essa possibilidade, para todas as amostras de ECN que apresentaram genes toxigênicos, foi realizada uma identificação genotípica para a confirmação da espécie. A técnica ITS-PCR não deixa dúvidas quanto ao padrão de bandas característico referente a cada espécie investigada quando comparada com espécies de referência internacional (ATCC), além de excluir possíveis erros

que possam ocorrer na identificação fenotípica. Embora tenham ocorrido algumas discrepâncias entre esses métodos, em relação a diferenciação da espécie, todas as amostras identificadas como ECN pelo método fenotípico confirmaram ser ECN pela técnica genotípica.

Eliminando-se possíveis erros de identificação, a divergência nos resultados obtidos em relação aos ECN serem capazes de produzir ou não toxinas pode estar relacionada a escolha da técnica adequada para extração do DNA e detecção de genes responsáveis pela expressão dessas enterotoxinas. A padronização das técnicas que vai desde o emprego de meios de crescimento, pH, temperatura e concentrações de nutrientes ideais bem como o uso de controles de extração, parâmetros utilizados nas reações de amplificação e enzimas, é fundamental para o bom desempenho da pesquisa. Sabe-se que uma das desvantagens da PCR multiplex é que ela destaca a presença dos genes que estão em maior frequência, mascarando ou não detectando os que aparecem em menor frequência, diferente da técnica PCR que utiliza um par de *primers* para cada reação, a qual é feita isoladamente para cada toxina investigada.

Nossos resultados revelaram uma predominância de amostras de ECN com o gene *sec-1* isolado ou associado a outros genes. Porém, na análise do tipo de gene de toxina em relação ao material clínico predominou o gene *seb*, sendo encontrado principalmente em amostras de *S. aureus* isoladas de corpo estranho e secreção. Esse resultado pode ser explicado pela maior frequência das amostras de *S. aureus* incluídas no estudo serem provenientes desses materiais clínicos, sendo 77,7% isoladas de corpo estranho e secreção e 22,3% de sangue.

Entretanto, a técnica de PCR permite a detecção de genes contidos nas linhagens independentes de sua expressão, pois mesmo o gene estando presente no microrganismo, ele pode não estar ativo. A técnica de RT-PCR permite ainda detectar a seqüência de RNAm responsável pela expressão da enterotoxina alvo, não deixando dúvidas quanto ao potencial tóxico do microrganismo.

Nossos estudos revelaram a expressão de RNAm que codificam as toxinas estafilocócicas em 43 (39,8%) das 108 amostras positivas pela técnica de PCR. O RNAm detectado correspondeu a toxinas da classe EEA, EEB, EEC e/ou TSST-1. A expressão de toxinas pelos ECN foi significativamente inferior quando comparada a dos *S. aureus*, correspondendo a 13,9% do total de amostras produtoras. O *S. epidermidis* foi a espécie mais toxigênica entre os ECN, sendo que cinco amostras foram positivas para a expressão de RNAm que codifica as EEA e EEC. Entre as outras espécies de ECN, somente o *S. lugdunensis* apresentou resultado positivo pela técnica de RT-PCR, para a EEC.

Alguns autores também relatam a produção de enterotoxinas e TSST-1 por *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* e *S. warneri* utilizando o método RPLA.<sup>76</sup> Udo et al.<sup>60</sup>, investigando manipuladores de alimentos também encontraram amostras de ECN e *S. aureus* produtores de enterotoxinas e TSST-1 pelo método RPLA. Do total de ECN investigados, 14,1% foram produtores de enterotoxinas ou TSST-1, sendo que amostras das espécies *S. hominis*, *S. warneri*, *S. saprophyticus*, *S. epidermidis*, *S. xylosus*, *S. haemolyticus* e *S. schleiferi* foram positivas para as toxinas EEA, EEB, EEC e/ou TSST-1. Marín et al.<sup>57</sup> descrevem estudo realizado com estafilococos produtores de enterotoxinas em amostras de presunto pelo

método RPLA. Dos 135 estafilococos isolados, dois pertenciam a espécie *S. epidermidis* e um foi produtor da EEC.

Cunha et al.,<sup>98</sup> estudando amostras de *S. aureus* com um ou mais genes específicos para a expressão de toxinas estafilocócicas encontraram 46,7% de amostras positivas pela técnica de PCR, enquanto que 38,3% das amostras foram produtoras das respectivas toxinas quando testadas pelo método RPLA. Ainda no mesmo estudo, 40% de amostras de ECN com um ou mais genes específicos para a expressão de toxinas, confirmaram a sua produção em 26,7% das amostras, pelo método RPLA. Esses mesmos autores em estudo para verificar os fatores de virulência de ECN isolados de RN, encontraram um percentual de 37,6% de ECN produtores de EEA, EEB ou EEC pelo método RPLA.<sup>114</sup>

As amostras toxigênicas de *S. aureus* investigadas nesse estudo apresentaram uma maior produção da EEB (68,8%), e da EEA (38,5%) quando avaliadas pela técnica RT-PCR. Segundo Niskanem & Koiranem<sup>115</sup>, linhagens de *S. aureus* produtoras de EEB têm sido observadas mais freqüentemente entre os estafilococos isolados de amostras clínicas de humanos, enquanto que linhagens produtoras de EEC são comumente de origem animal.

Vários estudos descrevem sistemas regulatórios estafilocócicos tais como os sistemas *agr*<sup>41</sup>, *sar*<sup>42</sup>, *rot*<sup>43</sup> que podem afetar diretamente a produção das enterotoxinas estafilocócicas. Novick<sup>116</sup> descreve a expressão do locus *agr* como um importante regulador em muitos dos fatores de virulência de *S. aureus*. Embora vários autores contestem o potencial toxigênico de ECN<sup>102,103</sup>, o operon *agr* que possui importante papel na regulação da expressão de toxinas

estafilocócicas, têm sido encontrado também em outras espécies de estafilococos, tais como *S. intermedius*<sup>117</sup>, *S. lugdunensis*<sup>46</sup> e *S. epidermidis*.<sup>47</sup> O locus *agr* de *S. epidermidis* apresenta uma homologia de 68% quando comparado com um locus *agr* de *S. aureus*,<sup>47</sup> além de apresentar os genes *agrA*, B, C e D envolvidos na regulação da produção de toxinas.

Além desses sistemas regulatórios presentes no microrganismo, alguns fatores do meio externo podem atuar diretamente na produção das enterotoxinas. Sabe-se que a produção das enterotoxinas é ótima em pH neutro e decresce em pH ácido. Bergdoll<sup>40</sup> descreve que a glicose no meio de cultura possui um importante efeito inibitório na produção das enterotoxinas, especialmente para as enterotoxinas EEB e EEC. Essa inibição deve-se a uma queda do pH como consequência do metabolismo da glicose. Segundo Regassa et al.<sup>118</sup> e Novick<sup>116</sup>, a glicose e a queda do pH podem estar associados à expressão de *agr*. Pereira et al.<sup>51</sup> analisaram a produção de EEA e EEB por ECN em diferentes temperaturas, valores de pH e concentração de NaCl. A maior produção ocorreu em temperatura 39,4°C e em pH 7,0. Portanto, a síntese de enterotoxinas pode diferir dependendo das condições laboratoriais e naturais.

O exato mecanismo pelo qual esses sistemas são ativados ou inibidos ainda não está bem esclarecido. A presença de um locus *agr* em espécies de *S. epidermidis* e a sua capacidade de produção de toxina delta associada a esse sistema *agr*<sup>47</sup> deixa evidente que o sistema está atuando e não exclui a possibilidade de produção de enterotoxinas em algum momento. Portanto, a predominância de *S. epidermidis* entre as espécies de ECN toxigênicas pode estar associada a esses sistemas regulatórios estafilocócicos também presentes

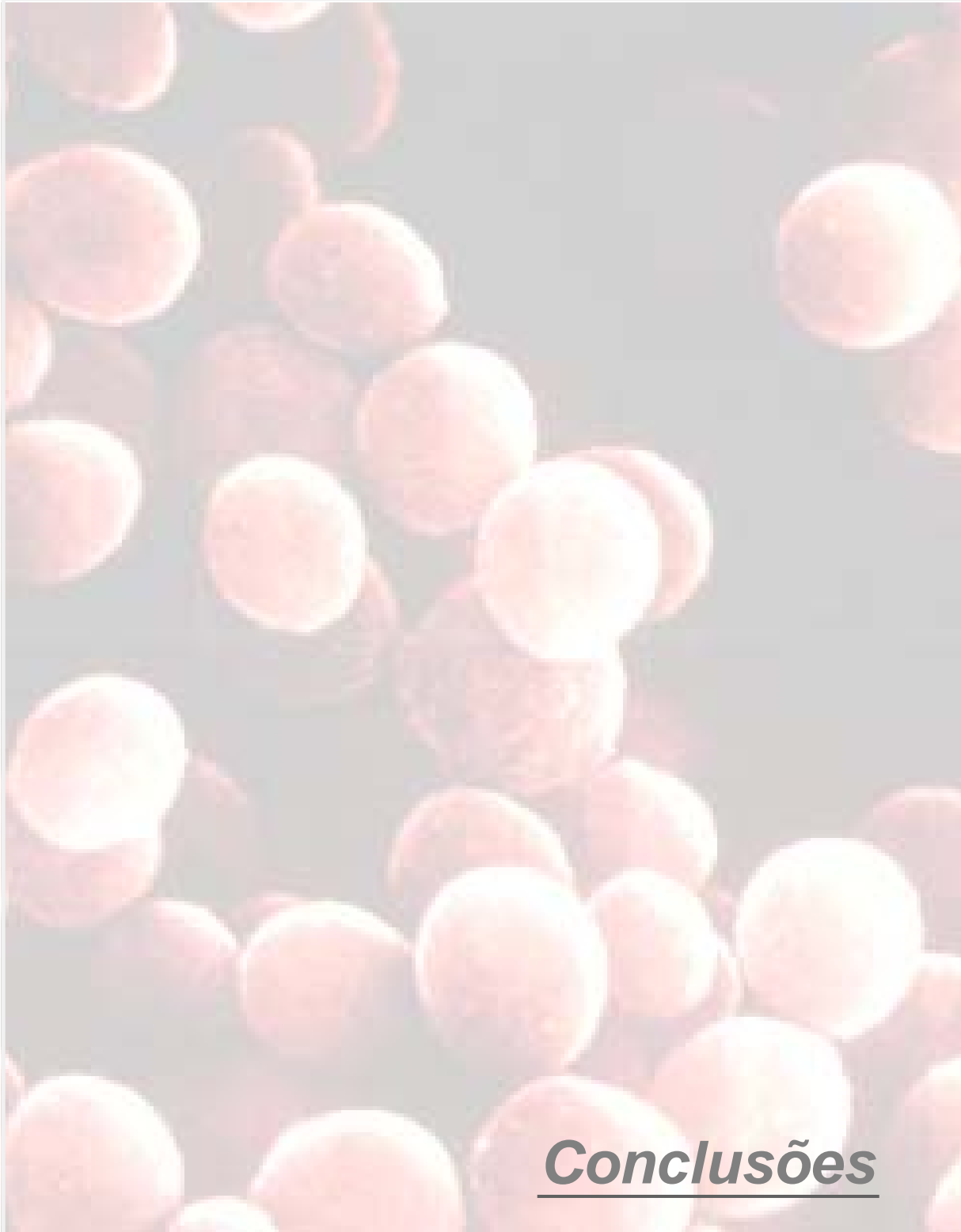
nessa espécie.

Diversos métodos imunológicos têm sido descritos para detectar a produção de enterotoxinas estafilocócicas e TSST-1, tais como os testes de imunodifusão, aglutinação de látex reversa e passiva (RPLA), ELISA e diversos kits disponíveis comercialmente. Porém, nem sempre esses métodos detectam amostras produtoras de toxinas, pois algumas linhagens produzem pequena quantidade de toxina que podem estar abaixo do limite de detecção do método utilizado.<sup>91</sup> Outras desvantagens dos métodos imunológicos são as reações inespecíficas e reações cruzadas entre antígenos que podem produzir resultados falso-positivos.<sup>85</sup>

Quando avaliamos o potencial toxigênico das amostras pela detecção de genes produtores de enterotoxinas e TSST-1, eliminamos todas essas desvantagens que ocorrem nos métodos imunológicos, pois estando o gene específico para a produção de determinada toxina presente na amostra, a possibilidade de produção da toxina não deve ser descartada.<sup>100,119,120</sup>

O método de PCR mostrou ser rápido e confiável para a determinação da presença de genes específicos de toxinas estafilocócicas, além de confirmar a identificação dos ECN pela técnica ITS-PCR, excluindo a possibilidade dessas amostras se tratarem de *S. aureus* mutantes. O método de RT-PCR também apresentou-se como uma técnica rápida e eficaz, deixando evidente a capacidade dos ECN de expressarem RNAm que codificam essas enterotoxinas, porém, como depende da ativação dos genes, uma maior investigação de fatores do meio e esclarecimento dos mecanismos regulatórios que possam estar interferindo em sua expressão devem ser avaliados.

Os resultados obtidos destacam os ECN como importantes patógenos, deixando evidente o seu potencial toxigênico, enfatizando que uma maior atenção deve ser dada a esses microrganismos que muitas vezes são considerados apenas contaminantes.



***Conclusões***

## 6. CONCLUSÕES

- *S. epidermidis* foi a espécie de ECN isolada com maior frequência de hemoculturas, pontas de cateteres, pontas de cânulas, pontas de drenos torácicos e secreções provenientes de recém-nascidos.
- Amostras de *S. warneri*, *S. hominis*, *S. lugdunensis*, *S. simulans*, *S. saprophyticus* e *S. xylosus* também foram isolados dos materiais clínicos estudados.
- Todas as amostras identificadas como ECN pela técnica fenotípica confirmaram essa identificação pelo método genotípico.
- O método de PCR mostrou ser rápido e confiável para a determinação de genes que codificam as toxinas estafilocócicas e também para a identificação de ECN.
- Todas as espécies de ECN isoladas, com exceção de *S. simulans*, apresentaram os genes dos tipos *sea*, *seb*, *sec-1* e/ou *tst* isolados ou associados.
- Amostras de *S. aureus* apresentaram genes toxigênicos para todas as classes de toxinas pesquisadas.

- O gene *sec-1* responsável pela expressão da EEC foi o mais detectado tanto em amostras de *S. aureus*, quanto em amostras de ECN, enquanto o gene *seb* foi mais freqüente em *S. aureus*.
- A detecção da expressão de RNAm que codifica as enterotoxinas e TSST-1 pela técnica RT-PCR foi mais freqüente na espécie *S. aureus*. Das cinco toxinas estudadas, todas foram expressas por *S. aureus*, enquanto espécies de ECN foram positivas somente para EEA e EEC.
- O método de RT-PCR apresentou-se como uma técnica rápida e eficaz, confirmando a capacidade toxigênica de *S. epidermidis* e *S. lugdunensis*.



***Referências  
Bibliográficas***

---

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS\*

1. Kloos WE, Bannerman TL. Staphylococcus and Micrococcus. In: Murray, P.R editors. Manual of clinical microbiology. Washington: American Society for Microbiology; 1999.p. 264-82.
2. Kloos WE, Bannerman T.L. *Staphylococcus* and *Micrococcus*. In: Murray, P.R,editors. Manual of clinical Microbiology. Washington: American Society Microbiology; 1995.p.282-98.
3. Koneman EW. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 5<sup>nd</sup> ed. Philadelphia: J.B.Lippincott; 1997.
4. Bennett RW, Notermans S, Tatini SR. Staphylococcal enterotoxins.In:Vanderzant, C, Splittstoessa, DF, editors. Compendium of methods for the microbiological examination of foods.Washington (DC): American Public Health Association; 1999. p.551-92.
5. Tenover FC, Gaynes RP. The epidemiology of Staphylococcus aureus infections. In: Fischetti, VA.,editors. Gram-positive pathogens. Washington (D.C): ASM Press; 2000. p. 414-21.
6. Bergdoll MS, Chesney PJ. Toxic shock syndrome. Boca Raton: CRC Press; 1991.
7. Kloos WE, Bannerman TL. Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci. J Clin Microbiol. 1994;7:117-10.
8. Lark RL. Four year prospective evaluation of nosocomial bacteremia: epidemiology, microbiology, and patient outcome. Diagn Microbiol Infect Dis. 2000;38:131-40.

---

\* International Committee of Medical Journal Editors. Uniform Requeriments for Manuscripts Submitted to Biomedical Journal: sample references.(homepage on the Internet). Bethesda: U.S. National Library of Medicine;2003(last update 2003 July 09; cited 2005 Jun 01).Available from:[http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform- requirements.htm](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform-requirements.htm)  
National Library of Medicine. List of journals indexed in Index Medicus. Washington, 2003.240p.

9. Edmond MB, Wallace SE, McClish DK, Pfaller MA. Nosocomial bloodstream infections in United States hospitals: a three-year analysis. *Clin Infect Dis.* 1999;29:239-44.
10. Freer JH, Arbuthnott JP. Toxins of *Staphylococcus aureus*. *Pharmacol Ther.* 1983;19:55-106.
11. Herman A. Superantigens: Mechanism of T-cell stimulation and role in immune responses. *Annu Rev Immunol.* 1991;9:745-72.
12. Bergdoll MS, Surgalla MJ, Dack GM. Staphylococcal enterotoxin: identification of a specific precipitating antibody with enterotoxin neutralizing property. *J Immunol.* 1959;83:334-8.
13. Casman EP. Further serological studies of staphylococcal enterotoxin. *J Bacteriol.* 1960;79:849-56.
14. Casman EP, Bennet RW, Dorsey AE, Issa, JA. Identification of a fourth staphylococcal enterotoxin, enterotoxin D. *J Bacteriol.* 1967;94:1875-82.
15. Bergdoll MS, Borja CR, Avena RM. Identification of a new enterotoxin as enterotoxin C. *J Bacteriol.* 1965;90:1481-5.
16. Avena RM Bergdoll, MS. Purification and some physicochemical properties of enterotoxin C, *Staphylococcus aureus* strain 361. *Biochemistry.* 1967;6:1474-80.
17. Reiser RF, Weiss KF. Production of staphylococcal enterotoxins A, B and C in various media. *Appl Environ Microbiol.* 1969;18:1041-3.
18. Yu cheng S, Wang ACL. Identification and purification of a new staphylococcal enterotoxin, H. *Appl Environ Microbiol.* 1995;61:1438-43.
19. Bergdoll MS. The staphylococcal toxins in human disease. In: Paradise LJ, Bendinelli M, Friedman H, editors. *Enteric Infections and Immunity*. New York: Plenum Press; 1996.p.169-83.

20. Munson SH. Identification and characterization of staphylococcal enterotoxin type G and I from *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun*. 1998;66:3337-48.
21. Jarraud S. A highly prevalent operon of enterotoxin gene forms a putative nurse of superantigens in *Staphylococcus aureus*. *J Clin Immunol*. 2001;166:669-77.
22. Zhang S, Iandolo JJ, Stewart C. The enterotoxin D plasmid of *Staphylococcus aureus* encodes a second enterotoxin determinant (SEJ). *FEMS Microbiol Lett*. 1998;168:227-33.
23. Kuroda M, Ohta T, Uchiyama I, Baba T, Yuzawa H, Kobayashi I, et al. Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet*. 2001;357:1225-40.
24. Omoe K, Hu DL, Omoe HT, Nakane A, Shinagawa K. Identification and characterization of a new staphylococcal enterotoxin-related putative toxin encoded by two kinds of plasmids. *Infect Immun*. 2003;71:6088-94.
25. Bergdoll MS, Crass BA, Reiser RF, Robbins RN, Davis JP. A new staphylococcal enterotoxin, enterotoxin F, associated with toxic-shock syndrome *Staphylococcus aureus* isolates. *Lancet*. 1981;1:1017-21.
26. Bergdoll MS. Identification of enterotoxin E. *Infect Immun*. 1971;4:5593-5.
27. Huy YH. *Foodborne disease handbook-diseases caused by bacteria*. New York: Marcel Dekker; 1994.
28. Marrack P, Kappler J. The staphylococcal enterotoxins and their relatives. *Science*. 1990;248:705-11.
29. Zhang S, Stewart GC. Characterization of the Promoter Elements for the Staphylococcal Enterotoxin D gene. *J Bacteriol*. 2000;182:2321-5.
30. Macmicking JD. Altered responses to bacterial infection and endotoxic shock in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Cell*. 1995;81:641-50.

31. Betley MJ , Löfdahl S, Kreiswirth BN, Bergdoll MS, Novick RP. Staphylococcal enterotoxin A gene is associated with a variable genetic element. Proc Natl Acad Sci. 1984;81:5179-83.
32. Schad EM, Papageorgiou AC, Svensson LA, Acharya KR. A structural and functional comparison of staphylococcal enterotoxins A and C2 reveals remarkable similarity and dissimilarity. J Mol Biol. 1997;269:270-80.
33. Balaban N, Rasooly A. Staphylococcal enterotoxins. Int J food Microbiol. 2000; 61:1-10.
34. Marr JC, Lyon JD, Roberson JR, Luper M, Davis WC, Bohach GA. Characterization of Novel Type C Staphylococcal Enterotoxins: Biological and Evolutionary Implications. Infect Immun. 1993;61:4254-62.
35. Shafer WM, Iandolo JJ. Chromosomal locus for staphylococcal enterotoxin B. Infect Immun. 1978;20:273-8.
36. Shalita Z, Hertman I, Sand S. Isolation and characterization of a plasmid involved with enterotoxin B production in *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol. 1977;129:317-25.
37. Letertre C, Perelle S, Dilasser F, Fach P. Identification of a new putative enterotoxin SEU encoded by the *egc* cluster of *Staphylococcus aureus*. J Appl Microbiol. 2003;95:38-43.
38. Omoe K, Imanishi K, Hu DL, Kato H, Omoe HT, Nakane A. et al. Biological Properties of Staphylococcal Enterotoxin-Like Toxin Type R. Infect Immun. 2004;72:3664-7.
39. Orwin PM, Leung DYM, Tripp TJ, Bobach GA, Earhart CA, et al. Characterization of a novel staphylococcal enterotoxin-like superantigen, a member of the group V subfamily of pyrogenic toxins. Biochemistry. 2002;41:14033-40.
40. Bergdoll MS. *Staphylococcus aureus*. In: Doyle MP, editor. Foodborne bacterial pathogens. New York: M. Dekker; 1989.p.463-523.

41. Peng HL, Novick RP, Kreiswirth B, Kornblum J, Schlievert P. Cloning, characterization, and sequencing of na accessory gene regulator (*agr*) in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* 1988;170:4365-72.
42. Cheung AL, Koomeyy JM, Butler CA, Projan SJ, Fischetti VA. Regulation of exoprotein expression in *Staphylococcus aureus* by a locus (*sar*) distinct from *agr*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1992;89:6462-6.
43. McNamara PJ, Milligan-Monroe KC, Khalili S, Proctor RA. Identification, cloning, and initial characterization of rot, a locus encoding a regulator of virulence factor expression in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* 2000;182:3197-203.
44. Garvis S, Mei JM, Ruiz-Albert J, Holden, DW. *Staphylococcus aureus svrA*: a gene requires for virulence and expression of the *agr* locus. *Microbiology.* 2002;148:3235-43.
45. Tegmark K, Morfeldt E, Arvidson S. Regulation of *agr*-dependent virulence genes in *Staphylococcus aureus* by RNAIII from coagulase-negative *staphylococci*. *J Bacteriol.* 1998;180:3181-6.
46. Vandenesch F, Projan SJ, Kreiswirth B, Etienne J, Novick RP. *Agr* –related sequences in *Staphylococcus lugdunensis*. *FEMS Microbiol.* 1993;111:115-22.
47. Van Wamel WJB, Van Rossum G, Verhoef J, Vandenbroucke-Grauls CMJE, Fluit AC. Cloning and characterization of an accessory gene regulator (*agr*)-like locus from *Staphylococcus epidermidis*. *FEMS Microbiol.* 1998;163:1-9.
48. Chan PF, Foster SJ. The role of environmental factors en the regulation of virulence-determinant expression in *Staphylococcus aureus* 8325-4. *Microbiology.* 1998;144:2469-79.
49. Troller JA . *Staphylococcal growth and productions factors control.* *J Milk Food Microbiol.* 1975;37:499-503.

50. Notermans S, Heuvelman, KJ, Wernsrdts, K. Synthetic enterotoxin B DNA probes for detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* strains. Appl Environ Microbiol. 1988;54:531-3.
51. Pereira JL, Salzberg SP, Bergdoll MS. Effect of temperature, pH and sodium chloride concentrations on production of staphylococcal enterotoxins A and B. J Food Prot. 1982;45:1306-9.
52. Adesyn AA, Tatini SR, Hoover DG. Production of enterotoxin by *Staphylococcus hyicus*. Vet Microbiol. 1984;9:487-95.
53. Hirooka EY, Müller EE, Freitas JC, Vicente E, Yoshimoto Y, Bergdoll MS. Enterotoxigenicity of *Staphylococcus intermedius* of canine origin. Int J Food Microbiol. 1988;7:185-91.
54. Olsvik O, Fossum K, Berdal BP. Staphylococcal enterotoxin A, B, and C produced by coagulase-negative strain within the family *Micrococcaceae*. Acta Pathol Microbiol Immunol Scand Sect. 1982;90:441-4.
55. Bautista L, A quantitative study of enterotoxin production by sheep milk staphylococci. Appl Environ Microbiol. 1988;54:566-9.
56. Valle J, Gomez-Lucia E, Piriz S, Goyache J, Orden J, Vadillo S. Enterotoxin production by staphylococci isolated from healthy goats. Appl Environ Microbiol. 1990;56:1323-6.
57. Marin ME, De La Rosa MC, Cornejo I. Enterotoxigenicity of *Staphylococcus* strains isolated from spanish cry-cured hams. Appl Environ Microbiol. 1992;58:1067-9.
58. Orden A. Applicability of an immunoblot technique combined with a semiautomated electrophoresis systems for detection of staphylococcal enterotoxins in food extracts. Appl Environ Microbiol. 1992;58:4083-5.
59. Vernozy RC, Mazuy C, Prevost G, Lapeire C, Bes M. Enterotoxin production by coagulase-negative staphylococci isolated from goats milk and cheeses. Int J Food Microbiol. 1996;30:271-80.

60. Udo, EE. Enterotoxin production by coagulase-negative staphylococci in restaurant workers from Kuwait City may be a potential cause of food poisoning. *J Med Microbiol.* 1999;48:819-23.
61. Bennett RW. Atypical toxigenic *Staphylococcus* and non-*Staphylococcus aureus* species on the horizon? an update. *J Food Prot.* 1996;59:1123-6.
62. Wen R. Major histocompatibility complex class II associated peptides control the presentation of bacterial superantigens to T cells. *J Exp Med.* 1996;183:1083-92.
63. Carmo LS. *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enteritidis* present in food implicated in food poisoning. *Rev Microbiol.* 1996;27:122-5.
64. Pereira ML. Enterotoxigenic staphylococci from food handlers working in an industrial kitchen in Belo Horizonte, MG (Brazil). *Rev Microbiol.* 1994;25:161-5.
65. Mori M, Kato E, Hamada S. Distribution of enterotoxigenic staphylococci in healthy food handlers and biological properties of isolates. *Japan J Bacteriol.* 1977;32:501-8.
66. Carmo LS, Dias RS, Linard, VR, Sena, MJ, Santos, DA. An outbreak of Staphylococcal Food Poisoning in the Municipality of Passos, Mg, Brazil. *Braz. Arch. Biol Technol.* 2003;46:581-6.
67. Polledo FJJ, García ML, Moreno B, Menes I. Importance of food handlers as source of enterotoxigenic Staphylococci. *Zentralbl Bakteriell, Mikrobiol Hyg.* 1985;181:364-73.
68. Evenson ML, Hinds MW, Berstein RS, Bergdoll MS. Estimation of human dose of staphylococcal enterotoxin A from a large outbreak of staphylococcal food poisoning involving chocolate milk. *Int J Food Microbiol.* 1988;7:311-6.
69. Casman EP, Bennett RW. Detection of staphylococcal enterotoxin in food. *Appl Microbiol.* 1965;13:181-9.

70. Ko HC, Chang TY. Using reversed passive latex agglutination method to detect enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* and enterotoxin in foods. J Food Drug Anal. 1995;3:57-63.
71. Nicolau ES. Avaliação do potencial de produção e tipos de enterotoxinas estafilocócicas encontradas em linhagens de e extratos de amostras de queijo tipo mussarela fabricado na região de Goiânia-GO.In:Anais do XVIII Congresso Nacional de Laticínios; 2000.p.92-101.
72. Shultz P, Raji L. Endogenously synthesized nitric oxide prevents endotoxin-induced glomerular thrombosis. J Clin Invest. 1992;90:1718-25.
73. Todd JK, Kapral FA, Fishaut M, Welch TR. Toxic shock syndrome associated with phage group 1 staphylococci. Lancet. 1978;1116-8.
74. Crass BA, Bergdoll MS. Involvement of coagulase-negative staphylococci in toxic shock syndrome. J Clin Microbiol. 1986;23:43-5.
75. Kahler RC, Boyce JM, Bergdoll MS, Lockwood WR, Taylor MR. Toxic shock syndrome associated with TSST-1 producing coagulase-negative staphylococci. American J Med Sci. 1986;292:310-2.
76. Valle J, Vadillo S, Piriz S, Gomez-Lucia E. Toxic Shock Syndrome Toxin 1(TSST-1) production by staphylococci isolated from goats and presence of specific antibodies to TSST-1 in serum and milk. Appl Environ Microbiol. 1991;57:889-91.
77. Cunha MLRS, Peresi E, Calsolari RAO, Araújo Jr JP. Detection of Enterotoxins genes in coagulase-negative Staphylococci isolated from foods. Braz J Microbiol. 2006;37:6469.
78. Tarkowski A, Wagner H. Arthritis and sepsis caused by *Staphylococcus aureus*: can the tissue injury be reduced by modulating the host's immune system? Mol Med Today. 1998;4:15-8.
79. Bremell T, Tarkowski A. Preferential induction of septic arthritis and mortality by superantigen-producing staphylococci. Infect Immun. 1995;63:4185-7.

80. Efuntoye MO, Adetosoye AL. Enterotoxigenicity and drug sensitivity of staphylococci from children aged five years and below with sporadic diarrhoea. *East Afr Med J.* 2002;80:656-9.
81. Bernstein JM, Ballow M, Schlievert PM, Rich G, Allen C, Dryja D. A superantigen hypothesis for the pathogenesis of chronic hyperplastic sinusitis with massive nasal polyposis. *Am J Rhinol.* 2003;17:321-6.
82. Michelin AF. Interação das enterotoxinas estafilocócicas com o sistema imune do hospedeiro. *Rev Ciênc Farm.* 2003;24:83-95.
83. Robbins R, Bergdoll MS. Production of rabbit antiserum to the staphylococcal of staphylococcal enterotoxins. *J Food Prot.* 1984;47:172-6.
84. Silverman SJ, Knott AR, Howard M. Rapid, sensitive assay for staphylococcal enterotoxin and a comparison of serological methods. *Appl Microbiol.* 1968;16:1019-23.
85. Cunha MLRS. Estafilococos enterotoxigênicos: efeito de cultura mista em leite, extrato de soja e parâmetros causadores de injúria celular. [Dissertação]. Londrina: Fundação Universidade Estadual de Londrina;1992.
86. Park CE, Szabo R. Evaluation of the reversed passive latex agglutination (RPLA) test kits for detection of staphylococcal enterotoxins A, B, C and D in foods. *J Clin Microbiol.* 1986;32:723-7.
87. Orth DS. Statistical analysis and quality control in radioimmunoassay for staphylococcal enterotoxins A,B and C. *Appl Environ Microbiol.* 1977;34:710-4.
88. Smith JL, Buchanan RL, Palumbo SA. Effect of food environmental on staphylococcal enterotoxin synthesis: a review. *J Food Prot.* 1983;46:545-5.
89. Bennett RW, Mc Clure F. Visual screening with enzyme immunoassay for staphylococcal enterotoxins in foods: collaborative study. *J AOAC International.* 1994;77:357-64.

90. Park CE, Akhtar M, Rayman MK. Evaluation of commercial enzyme immunoassay kit (RIDASCREEN) for detection of staphylococcal enterotoxins A, B, C, D e E in foods. *Appl Environ Microbiol.* 1994;60:677-81.
91. Gomez-lucia E. Production of enterotoxin A by supposedly nonenterotoxigenic *Staphylococcus aureus* strain. *Appl Environ Microbiol.* 1989;55:1447-51.
92. Iandolo JJ. Genetic analysis of extracellular toxins of *Staphylococcus aureus*. *Annu Rev Microbiol.* 1989;43:3375-402.
93. Johnson W.M. Detection of genes for enterotoxins, exfoliative toxins, and toxic shock syndrome toxin 1 in *Staphylococcus aureus* by the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 1991;29:26-430.
94. Jarraud S. Involvement of enterotoxins G and I in staphylococcal toxic shock syndrome and staphylococcal scarlet fever. *J Clin Microbiol.* 1999;37:2446-9.
95. Padmapriya BP. Staphylococcal accessory gene regulator (*sar*) as a signature gene to detect enterotoxigenic staphylococci. *J Appl Microbiol.* 2003;95:974-81.
96. Rosec JP, Gigaud O. Staphylococcal enterotoxin genes of classical and new types detected by PCR in France. *J Food Microbiol.* 2002;77:61-70.
97. Becker K, Haverkämper G, Von Eiff C, Peters G. Survey of staphylococcal enterotoxin genes exfoliative toxin genes, and toxic shock syndrome toxin 1 gene in non-*Staphylococcus aureus* species. *J Clin Microbiol Infect Dis.* 2001;20:407-9.
98. Cunha MLRS, Calsolari RAO, Araújo Júnior JP. Detection of enterotoxin and toxic shock syndrome toxin 1 genes in staphylococcus, with emphasis on coagulase-negative staphylococci. *Microbiology and Immunology*, 2006.
99. Tsen HY, Chen TR. Use of the polymerase chain reaction for specific detection of type A, D and E enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in foods. *Appl Microbiol Biotechnol.* 1992;37:685-90.

100. Schmitz FJ, Steiert M, Hofmann B, Verhoef J, Hadding U, Heinz HP et al. Development of multiplex-PCR for direct of genes for enterotoxin B and C, and toxic shock syndrome toxin-1 in *Staphylococcus aureus* isolates. *J Med Microbiol.* 1998;47:335-40.
101. Couto I, Pereira S, Miragaia M, Sanches IS, Lencastre H. Identification of clinical staphylococcal isolates from humans by Internal Transcribed Spacer PCR. *J Clin Microbiol.* 2001;39:3099-103.
102. Lotter LP, Genigeorgis CA. Deoxyribonucleic acid base composition and biochemical properties of certain coagulase-negative enterotoxigenic cocci. *Appl Microbiol.* 1975;29:152-158.
103. Fox LK, Besser TE, Jackson SM. Evaluation of a coagulase-negative variant of *Staphylococcus aureus* as a cause of intramammary infections in a herd of dairy cattle. *J Vet Med Assoc.* 1996;209:1143-6.
104. Yarwood JM, McCormick JK, Paustian ML, Kapur V, Schlievert PM. Repression of the *Staphylococcus aureus* accessory gene regulator in serum and in vivo. *J Bacteriol.* 2001;184:1095-101.
105. Baker JS. Comparison of various methods for differentiation of staphylococci and micrococci. *J Clin Microbiol.* 1984;19:875-9.
106. Kloos WE, Schleifer KH. Simplified scheme for routine identification of human *Staphylococcus* spp. *J Clin Microbiol.* 1975;1:82-8.
107. Sambrook J, Russell DW. 2001. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
108. Mason WJ, Blevins JS, Beenken K, Wibowo N, Ojha N, Smeltzer MS. Multiplex PCR protocol for the diagnosis of staphylococcal infection. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 3332–8 Multiplex PCR protocol for the diagnosis of staphylococcal infection.
109. Miwa N, Kawamura TM, Akiyama M. An outbreak of food poisoning due to egg yolk reaction negative *Staphylococcus aureus*. *Int J F Microbiol.* 2001;64:361-6.

110. Holecková B, Holoda E, Fotta M, Kalináková V, Gondol J, Grolmus J. Occurrence of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in food. *Ann Agric Environ Med.* 2002;9:179-82.
111. Bergdoll MS. Importance of staphylococci that produce nanogram quantities of enterotoxin. *Int J Med Microbiol Virol Parasitol Infect Dis.* 1995;2821-6.
112. Kreiswirth BN, Schlievert PM, Novick RP. Evaluation of coagulase-negative staphylococci for ability to produce toxic shock syndrome toxin 1. *J Clin Microbiol.* 1987;25:2028-9.
113. Victor R, Lachica F, Weiss KF et al. Relationships among coagulase, enterotoxin, and heat-stable deoxyribonuclease production by *Staphylococcus aureus*. *Applied Microbiology.* 1969;18:126-7.
114. Cunha MLRS, Rugolo LMSS, Lopes CAM. Study of virulence factors in coagulase-negative staphylococci isolated from newborns. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2006;101:661-8.
115. Niskanen A, Koironen L. Correlation of enterotoxin and thermonuclease production with some physiological and biochemical strains isolated from different sources. *J Food Prot.* 1977;40:178-82.
116. Novick RP, Jiang D. The staphylococcal *saeRS* system coordinates environmental signals with *agr* quorum sensing. *Microbiology.* 2003;149:2709-17.
117. Sung JML, Chantler PD, Lloyd, DH. Accessory gene regulator locus of *Staphylococcus intermedius*. *Infect Immun.* 2006;74:2947-56.
118. Regassa LB, Betley MJ. Alkaline pH decreases expression of the accessory gene regulator (*agr*) in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* 1992;174:5095-100.
119. Wilson IG, Cooper JE, Gilmour A. Detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in dried skimmed milk: use of the Polymerase Chain Reaction for amplification and detection of staphylococcal enterotoxin genes

*entB* and *entC1* and the thermonuclease gene *nuc*. Appl Environ Microbiol. 1991;57:1793-8.

120. Becker K, Roth R, Peters G. Rapid and specific detection of toxigenic *Staphylococcus aureus*: use of two multiplex PCR enzyme immunoassays for amplification and hybridization of staphylococcal enterotoxin genes, exfoliative toxin genes, and toxic shock syndrome toxin 1 gene. J Clin Microbiol. 1998;36:2548-53.