

GABRIELA NOGUEIRA VIÇOSA

VARIABILIDADE GENÉTICA E IDENTIFICAÇÃO DO POTENCIAL
ENTEROTOXIGÊNICO DE *Staphylococcus* spp. ISOLADOS DE LEITE CRU E QUEIJO
FRESCAL

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA

MINAS GERAIS - BRASIL

2012

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

V639v
2012

Viçosa, Gabriela Nogueira, 1988-
Variabilidade genética e identificação do potencial
enterotoxigênico de *Staphylococcus* spp. isolados de leite cru e
queijo fresco / Gabriela Nogueira Viçosa. – Viçosa, MG,
2012.
xi, 102f. : il. ; 29cm.

Orientador: Luís Augusto Nero
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f. 80-102

1. *Staphylococcus*. 2. Enterotoxinas. 3. Genes. 4. Leite.
5. Queijo. 6. Intoxicação alimentar. 7. Testes imunológicos.
8. Teste microbiológicos. 9. Microbiologia de alimentos.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Veterinária. Programa de Pós-Graduação em Medicina
Veterinária. II. Título.

CDD 22. ed. 664.001579

GABRIELA NOGUEIRA VIÇOSA

VARIABILIDADE GENÉTICA E IDENTIFICAÇÃO DO POTENCIAL
ENTEROTOXIGÊNICO DE *Staphylococcus* spp. ISOLADOS DE LEITE CRU E QUEIJO
FRESCAL

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Aprovada: 20 de Novembro de 2012.

Prof. Antônio Fernandes de Carvalho

Prof. Luiz Simeão do Carmo

Prof. Luís Augusto Nero
(Orientador)

« En vérité, le chemin importe peu:
la volonté d'arriver suffit à tout. »
Albert Camus

*À minha mãe, Elma,
por toda uma vida de dedicação.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha mãe, Elma, por todo esforço realizado em prol dos meus estudos.

Ao meu pai, Frank, agradeço as palavras sempre motivadoras.

À minha avó, Ereni, agradeço todo o carinho e preocupação.

À Tia Cristina, agradeço todo o tipo de suporte proporcionado.

Aos meus irmãos, Isadora e Gabriel, por motivarem a minha vontade de melhorar em todos os aspectos.

Ao Prof. Nero, que apesar das palavras serem poucas para expressar a minha gratidão, agradeço principalmente pela amizade cultivada durante esses seis anos de trabalho, por estar sempre presente, apoiando as minhas idéias e me acalmando nas horas mais difíceis, e por ter acreditado no meu potencial como pesquisadora desde o início da minha formação acadêmica.

Aos funcionários do SMVPSP do DVT- UFV, principalmente ao Dagô e Luís, pela paciência e por estarem sempre à disposição quando eu precisei.

Aos amigos Dridri, Lu e Michelle, por serem os meus verdadeiros companheiros nesta jornada, compartilhando intensamente todos os momentos.

Ao meu namorado Bruno, agradeço todo o amor, paciência e apoio incondicionais.

Às irmãs de república, em especial à Gabi, pela compan^oia diária e amizade verdadeira.

Ao Alban Le Loir, pela grande parceria na reta final deste trabalho.

À equipe do Aliança Francesa de Viçosa/MG, por ter sido de imensa importância para a minha formação.

Ao Dr. Yves Le Loir, por ter contribuído com idéias essenciais à finalização desta dissertação.

Ao Prof. Antônio Fernandes, por ter sido o elo indispensável à elaboração de parte deste trabalho.

À Profa. Marisa de Queiroz, do DMB-UFV, pelo auxílio inicial na padronização da PFGE.

Ao Prof. Wladimir Padilha, por ter me acolhido anteriormente em sua equipe, onde adquiri parte dos conhecimentos necessários à execução deste trabalho e fiz bons amigos.

À CAPES, pelo financiamento da minha formação durante os dois anos de Mestrado.

À vida, por todos os momentos bons e ruins, responsáveis por moldar o meu caráter e me conduzirem à esta ocasião decisiva.

E à todos aqueles que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho, minha sincera gratidão.

CONTEÚDO

LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	ix
RESUMO	x
ABSTRACT	xi
INTRODUÇÃO GERAL	1
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
1. Características gerais do gênero <i>Staphylococcus</i>	2
2. Importância do gênero <i>Staphylococcus</i> em alimentos	5
2.1. Impacto dos fatores intrínsecos e extrínsecos dos alimentos na multiplicação de <i>S. aureus</i> e produção de enterotoxinas	7
2.2. Prevalência de surtos de intoxicação alimentar estafilocócica no Brasil e no mundo	10
3. Enterotoxinas estafilocócicas	16
3.1. Características gerais	16
3.2. Determinantes genéticos e regulação da expressão das enterotoxinas estafilocócicas	20
4. Métodos de enumeração e detecção de <i>S. aureus</i> em alimentos	26
5. Métodos de detecção e quantificação de enterotoxinas estafilocócicas	30
6. Métodos de tipificação e determinação da variabilidade genética de <i>S. aureus</i>	33
7. Perspectivas e desafios	38
OBJETIVOS	41
Objetivo geral	41
Objetivos específicos	41
MATERIAL E MÉTODOS	42
1. Coleção de micro-organismos	42
2. Caracterização fenotípica dos isolados	42
3. Verificação da produção de enterotoxinas estafilocócicas	44
4. Caracterização molecular dos isolados bacterianos	44

4.1. Determinação da variabilidade genética dos isolados por eletroforese em campo pulsado (PFGE)	44
4.2. Extração de DNA	46
4.3. Detecção de genes de enterotoxinas estafilocócicas por PCR convencional .	46
4.4. Detecção e diferenciação do locus <i>egc</i> por RFLP-PCR	49
4.5. Detecção do <i>locus agr</i> por PCR	53
4.6. Sequenciamento parcial do <i>locus egc</i> e do <i>locus agr</i>	53
RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
CONCLUSÕES.....	79
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	80

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática da ativação de células T por antígenos (Ag) convencionalmente processados e por superantígenos (Manders, 1998).....	17
Figura 2. Representação esquemática da estrutura secundária de SEC ₃ , exibindo os domínios A e B da proteína (Dinges et al., 2000).....	19
Figura 3. Visão geral das técnicas atualmente disponíveis para a caracterização de surtos causados por enterotoxinas estafilocócicas, bem como para a determinação do potencial enterotoxigênico de cepas de <i>Staphylococcus</i> spp. isoladas de alimentos (Hennekinne et al., 2012).....	39
Figura 4. Sítios de clivagem das diferentes enzimas de restrição utilizadas no protocolo de RFLP-PCR para determinação da natureza do locus <i>egc</i> (Collery et al., 2007; Collery et al., 2009).....	51
Figura 5. Exemplo de gel de PFGE contendo diferentes perfis de macrorrestrição pela endonuclease <i>Sma</i> I de isolados de estafilococos obtidos de amostras de leite cru e queijo fresco. M: marcador de peso molecular <i>Pulse Marker</i> TM 50-1,000 Kb (Sigma-Aldrich Inc.)	57
Figura 6. Dendograma obtido considerando os perfis de PFGE de isolados de estafilococos coagulase-positivos oriundos de amostras de leite cru e queijo fresco, e identificação dos grupos <i>egc</i> e <i>agr</i> detectados. ND: grupo <i>agr</i> não determinado.....	59
Figura 7. Dendograma obtido considerando os perfis de PFGE de isolados de estafilococos coagulase-negativos oriundos de amostras de leite cru e queijo fresco, e identificação dos grupos <i>egc</i> e <i>agr</i> detectados. ND: grupo <i>agr</i> não determinado.....	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características bioquímicas de espécies de <i>Staphylococcus</i> coagulase-positiva (Modificado de Roberson, Fox, Hancock, Besser, 1992).	4
Tabela 2. Principais fatores que interferem na multiplicação e formação de enterotoxinas por <i>S. aureus</i> em alimentos (Modificado de Schelin et al., 2011).	8
Tabela 3. Enterotoxinas estafilocócicas e seus determinantes genéticos (Modificado de Schelin et al., 2011).	23
Tabela 4. Oligonucleotídeos utilizados na amplificação de genes de enterotoxinas estafilocócicas pela reação da polimerase em cadeia.....	48
Tabela 5. Sequência nucleotídica dos oligonucleotídeos desenhados por Letertre et al. (2003b) para a detecção da natureza do <i>locus egc</i>	49
Tabela 6. Oligonucleotídeos desenhados por van Leeuwen, van Nieuwenhuizen, Gijzen, Verbrugh, van Belkum (2000) e utilizados na amplificação e sequenciamento da porção variável do <i>locus agr</i> , segundo o protocolo de Gilot, Lina, Cochard, Poutrel (2002).	53
Tabela 7. Frequência dos genótipos encontrados na pesquisa de genes para enterotoxinas clássicas e sua relação com a produção de enterotoxinas, coagulase e termonuclease.	62
Tabela 8. Genótipos definidos a partir da presença de genes de enterotoxinas em cepas de <i>Staphylococcus</i> spp. isoladas de amostras de leite cru e queijo fresco.....	63
Tabela 9. Frequência de genes das enterotoxinas estafilocócicas <i>seg a seu</i> agrupados de acordo com os genótipos de enterotoxinas clássicas (<i>sea-see</i>) apresentados por isolados de <i>Staphylococcus</i> spp. oriundos de leite cru e queijo fresco.....	66
Tabela 10. Características bioquímicas e genotípicas dos cinco isolados caracterizados como <i>egc</i> positivos segundo o protocolo de RFLP-PCR.....	70
Tabela 11. Comparação dos dados do sequenciamento parcial do <i>locus egc</i> de cinco isolados de estafilococos provenientes de leite cru e queijo fresco com as sequências-referência depositadas no banco de dados do NCBI.	72

RESUMO

VIÇOSA, Gabriela Nogueira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Novembro de 2012. **Variabilidade genética e identificação do potencial enterotoxigênico de *Staphylococcus* spp. isolados de leite cru e queijo frescal.** Orientador: Luís Augusto Nero.

O gênero *Staphylococcus* é constituído de inúmeras espécies patôgenicas, especialmente *S. aureus*, que estão frequentemente relacionados a surtos de intoxicação alimentar, principalmente em leite e derivados. Essa atividade patogênica se deve à capacidade de algumas cepas em produzir enterotoxinas termoestáveis. A detecção de *S. aureus* em alimentos é realizada através de métodos clássicos de cultivo, porém requer testes complementares, que visam a caracterização adequada do potencial patogênico dos isolados. O objetivo deste trabalho foi caracterizar o potencial enterotoxigênico e determinar o grau de variabilidade genética de isolados de *Staphylococcus* spp.. A partir de uma coleção de micro-organismos obtidos de leite cru e queijo frescal em um estudo preliminar, 89 isolados foram selecionados e submetidos à análises fenotípicas (produção de coagulase e termonuclease, perfil bioquímico e produção de enterotoxinas) e moleculares (macrorrestrição por *Sma*I, PCR para genes de enterotoxinas e sequenciamento de DNA). As análises de PFGE dos perfis de macrorrestrição por *Sma*I revelaram uma população altamente heterogênea. Dos 89 isolados, 15,7% dos isolados foram produtores de enterotoxinas clássicas. 21,4% dos isolados apresentaram resultados correspondentes entre a presença de genes e a detecção de enterotoxinas. 62,9% dos isolados apresentaram ao menos um dos genes de enterotoxinas clássicas, sempre em associações com os demais genes de enterotoxinas pesquisados. Todos os isolados apresentaram ao menos um dos genes de enterotoxinas pesquisados, em diversas combinações, com a ocorrência de 59 genótipos diferentes. *sek* foi o gene menos observado, enquanto *sei* esteve presente em 98,9% dos isolados. O *locus egc* foi detectado em 5 isolados, porém sua presença foi observada de forma incompleta em diversos isolados. O sequenciamento parcial do *locus agr* em 41 isolados revelou a ocorrência dos grupos *agr* I (68,3%) e II (31,7%). Não foram encontradas associações significativas entre grupos *agr*, perfis de genes de enterotoxinas, ocorrência do *egc*, perfis obtidos na PFGE e produção de enterotoxinas. As observações do presente estudo sugerem a ausência de marcadores idealmente correlacionados com a capacidade enterotoxigênica de isolados de estafilococos provenientes de amostras de alimentos, o que demanda a realização de outros estudos para compreender melhor a ocorrência dessas associações.

ABSTRACT

VIÇOSA, Gabriela Nogueira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, November, 2012. **Enterotoxigenic potential and genetic variability of *Staphylococcus* spp. strains isolated from raw milk and soft fresh cheese.** Adviser: Luís Augusto Nero.

The genus *Staphylococcus* is constituted of numerous pathogenic species, including *S. aureus*, which is often related to food poisoning cases and outbreaks, especially in dairy products. Its pathogenic activity is due to the ability of some strains to produce thermostable enterotoxins (SE). *S. aureus* detection in foods is often performed using conventional methods, which requires additional tests, such as biochemical and molecular characterization with the purpose of estimating its enterotoxigenic potential. The aim of this study was to characterize the enterotoxigenic potential of *Staphylococcus* spp. isolates and determine their genetic variability. In a previous study, a *Staphylococcus* spp. culture collection was obtained, from which 89 isolates were selected and subjected to phenotypical (coagulase and thermonuclease production, biochemical profile and SE production) and molecular analysis (*Sma*I macrorestriction, SE gene detection by PCR and DNA sequencing). PFGE analysis obtained by *Sma*I macrorestriction patterns revealed a highly heterogeneous population. Of the 89 isolates, 15.7% were capable of producing classical enterotoxins (SEA-SEE). 21.4% of isolates showed matching results between production of enterotoxins and detection of classical SE genes. 62.9% of isolates showed at least one of the classical SE genes, in association with other non-classical SE genes. SE genes were observed in all isolates and in different combinations, which revealed 59 distinct genotypes. *sek* was the least frequent observed SE gene, while *sei* was present in 98.9% of isolates. Partial sequencing of *agr* locus in 41 isolates showed the occurrence of *agr* groups I (68.3%) and II (31.7%). No significant associations were found between *agr* groups, enterotoxin genes profiles, occurrence of *egc* cluster, PFGE profiles and/or SE production. Our findings suggest the absence of phenotypic or genotypic markers ideally correlated with the enterotoxigenic production of staphylococci of food origin, which demands further studies for better understanding the occurrence of these associations.

INTRODUÇÃO GERAL

S. aureus é uma das espécies patogênicas mais importantes do gênero *Staphylococcus*. Esta espécie está frequentemente associada a casos e surtos de toxinfecções alimentares em todo mundo, devido à capacidade de algumas cepas em produzirem enterotoxinas termoestáveis, que quando ingeridas, podem levar a distúrbios gastrintestinais, como náuseas, vômito e diarreia. A detecção de *S. aureus* em alimentos é realizada através de metodologias convencionais de cultivo microbiológico, nas quais se utilizam testes bioquímicos, como o da coagulase e termonuclease, para estimar o potencial de produção de enterotoxinas. No entanto, para efetivamente detectar a presença dessas substâncias, é necessária a realização de testes laboratoriais complementares, que apresentam diversas inconveniências, como a baixa especificidade e o aumento no tempo requerido para a conclusão da análise.

Novas estratégias para a detecção deste micro-organismo e suas enterotoxinas têm sido propostas. Os protocolos de análises moleculares, por exemplo, têm por objetivo a detecção de regiões específicas do DNA deste micro-organismo ou responsáveis pela codificação de enterotoxinas. Essas novas metodologias configuram alternativas viáveis às metodologias convencionais, uma vez que permitem uma caracterização específica do potencial enterotoxigênico dos isolados. Adicionalmente, a diversidade de isolados de estafilococos obtidos de alimentos pode ser avaliada através de técnicas moleculares, como a PFGE e MLST, utilizadas principalmente para determinar o caráter clonal da população e na investigação de surtos de intoxicações alimentares.

Com base nessas evidências, o objetivo deste estudo foi avaliar o potencial enterotoxigênico de isolados de *Staphylococcus* spp. obtidos de amostras de leite cru e queijo fresco.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Características gerais do gênero *Staphylococcus*

O gênero *Staphylococcus* pertencente à família *Staphylococcaceae*, ordem Bacillales, classe Bacilli e filo Firmicutes, é atualmente composto por 47 espécies e 24 subespécies (Euzéby, 2012). Esse gênero foi inicialmente descrito em 1880 pelo cirurgião escocês Alexander Ogston, a partir de abscessos presentes em feridas cirúrgicas. Posteriormente, em 1884, o cirurgião alemão Friedrich Julius Rosenbach realizou o isolamento de duas espécies de *Staphylococcus*, às quais nomeou de acordo com a presença ou ausência de pigmentos: *Staphylococcus aureus* e *S. albus* (atualmente denominada *S. epidermidis*) (Bergdoll, Wong, 2006).

Os micro-organismos pertencentes ao gênero *Staphylococcus* são caracterizados genericamente como cocos Gram-positivos, de diâmetro variado (0,5 e 1,5 μm), imóveis, não formadores de esporos, que podem ocorrer microscopicamente de forma isolada, em pares, tétrades, cadeias ou em agrupamentos semelhantes a cachos de uva (do grego: σταφυλή, *staphylē*, cachos de uva) (Hermans, Devriese, Haesebrouck, 2008). Apresentam metabolismo principalmente respiratório, com produção de catalase (exceto *S. aureus* subsp. *anaerobius* e *S. saccharolyticus*, catalase-negativos e anaeróbios estritos), além de metabolismo fermentativo, com a capacidade de transformar diversos carboidratos em ácidos, sem formação de gás (Varnan, Evans, 1996).

Os padrões mínimos exigidos para classificar um micro-organismo como pertencente ao gênero *Staphylococcus* são divididos em critérios genotípicos e fenotípicos (Freney et al., 1999). Os critérios genotípicos compreendem a determinação do conteúdo cromossomal de guanina e citosina (G+C) (normalmente entre 30-40%), conjuntamente com a análise filogenética das sequências dos genes de DNA ribossomal (rDNA) 16S ou 23S. As principais características fenotípicas a serem pesquisadas são a

coloração de Gram; observação da morfologia, tamanho e característica de agregação das células ao microscópio; produção de catalase; teste de motilidade e determinação da ultra-estrutura e composição da parede celular, sendo esta normalmente espessa, majoritariamente composta por peptidoglicano, ácido teicóico e proteínas. Além disso, a parede celular dos estafilococos apresenta resistência à clivagem pela lisozima, sendo por outro lado altamente sensível à lisostafina, enzima que cliva especificamente as pontes cruzadas de peptidoglicano com pentaglicina (Zygmunt, Browder, Tavormina, 1967).

Com base na produção da enzima extracelular coagulase, responsável por coagular o sangue através da ativação da protrombina e converter o fibrinogênio em fibrina, as espécies do gênero *Staphylococcus* podem ser divididas em dois grupos: coagulase-positivas (ECP) e coagulase-negativas (ECN). Algumas espécies de estafilococos um tipo de coagulase denominada “livre”, que é uma enzima extracelular que cataliza a reação entre uma substância presente no plasma, denominada de “fator de reação de coagulase” e o fibrinogênio, formando fibrina. Outras espécies produzem a coagulase denominada “ligada”, que está presente na superfície da parede celular bacteriana e reage diretamente com o fibrinogênio presente no plasma, produzindo uma rápida aglutinação das células bacterianas (Halpin-Dohnalek, Marth, 1989). Tanto a coagulase livre como a ligada podem recobrir as células bacterianas com fibrina e torná-las resistentes à opsonização e à fagocitose, diminuindo a concentração de fibrinogênio no sangue circulante (Koneman, 2005) A coagulase não atua sozinha, mas como uma co-participante com outras toxinas estafilocócicas e fatores celulares em um fenômeno complexo de patogenicidade (Halpin-Dohnalek et al., 1989). A capacidade de produzir a coagulase é restrita às espécies *S. pseudintermedius*, *S. lutrae*, *S. schleiferi* subsp. *coagulans*, *S. delphini*, *S. hyicus*, *S. intermedius*, *S. aureus* subsp. *anaerobius* e *S. aureus* subsp. *aureus* (Hermans et al., 2008).

Dentre os ECP, as espécies patogênicas de maior importância são *S. hyicus*, *S. intermedius* e *S. aureus* (Adesiyun, Tatini, Hoover, 1984; Hoover, Tatini, Maltais, 1983; Khambaty, Bennett, Shah, 1994; Vandenesch et al., 1995). Estas três espécies apresentam diversas semelhanças quanto às características bioquímicas e morfológicas (Tabela 1), como a produção de termonuclease, uma endonuclease termoestável capaz de degradar DNA e RNA, que está muitas vezes associada com a presença de coagulase (Menzies, 1977; Park et al., 1980; Park, El Derea, Rayman, 1978; Victor, Lachica, Weiss, Deibel, 1969). Entretanto, é preciso ressaltar que existem cepas atípicas de *S. aureus* que não produzem coagulase e/ou termonuclease (Matthews, Roberson, Gillespie, Luther, Oliver, 1997) e que *S. hyicus* apresenta produção variável desta enzima, sendo frequentemente considerada negativa ou muito fraca (Hermans et al., 2008).

Tabela 1. Características bioquímicas de espécies de *Staphylococcus* coagulase-positiva (Modificado de Roberson, Fox, Hancock, Besser, 1992).

Espécies	Características bioquímicas					
	Coagulase ¹	TNase ²	Manitol ³	Maltose ⁴	Manitol ⁵	BPm ⁶
<i>S. aureus</i>	+	+	+	+	+	+
<i>S. intermedius</i>	+	+	(+)	d	-	-
<i>S. hyicus</i>	(+)	+	d	d	-	-
<i>S. schleiferi</i> subsp. <i>coagulans</i>	+	+	(+)	-	ND	ND
<i>S. delphini</i>	+	-	d	+	ND	ND

Símbolos: +, ≥ 90% da espécie ou cepas são positivas; -, ≥ 90% da espécie ou cepas são negativas; (+), 11 a 89% das cepas são positivas; d, reação demorada; ND, não determinado

¹ Produção de coagulase livre;

² Produção de termonuclease;

³ Fermentação aeróbica do manitol;

⁴ Fermentação aeróbica da maltose;

⁵ Fermentação anaeróbica do manitol;

⁶ Crescimento em ágar Baird-Parker modificado, suplementado com acriflavina (7 µg/mL).

Devido à notória capacidade de secretar inúmeras enzimas e toxinas, os micro-organismos do gênero *Staphylococcus*, em particular *S. aureus*, são capazes de causar patologias diversas, tanto em seres humanos quanto em animais, que podem incluir desde infecções localizadas, como abscessos e pústulas, além de processos mais graves, como pneumonias e até mesmo septicemia. Dentre as manifestações mais comuns causadas por toxinas estafilocócicas, pode-se citar a síndrome da pele escaldada (exotoxina A), a síndrome do choque tóxico (toxina TSST-1) e ainda as intoxicações alimentares (Arbuthnott, Coleman, Azavedo, 1990; Corbella et al., 1997).

2. Importância do gênero *Staphylococcus* em alimentos

As intoxicações alimentares estafilocócicas são resultantes da ingestão de alimentos que contenham enterotoxinas estafilocócicas (EE) pré-formadas, oriundas da multiplicação de cepas de estafilococos enterotoxigênicos. Casos e surtos de intoxicação alimentar determinados por EE são bastante comuns, sendo alvo de inúmeras medidas de prevenção e controle por parte das autoridades de Saúde Pública.

Os alimentos implicados em casos de intoxicação alimentar estafilocócica variam entre os países e, até mesmo, entre as regiões de um mesmo país, devido às possíveis diferenças nos hábitos alimentares (Le Loir, Baron, Gautier, 2003). Leite e derivados lácteos, como leite cru e queijos, são os alimentos mais associados a casos e surtos de intoxicação alimentar estafilocócica (Cenci-Goga, Karama, Rossitto, Morgante, Cullor, 2003). No entanto, tortas recheadas com creme, derivados cárneos, saladas e outros alimentos prontos para o consumo podem ser veículos do micro-organismo e de suas enterotoxinas (Anunciação, Linardi, Do Carmo, Bergdoll, 1995; Atanassova, Meindl, Ring, 2001; Sergelidis et al., 2012). Portanto, é consenso que os quadros de intoxicação alimentar estão associados a alimentos que exigem intensa manipulação durante ou após o seu preparo e que sejam acondicionados em temperaturas inadequadas, favorecendo

assim a multiplicação do micro-organismo e a produção de enterotoxinas (de Santana, Beloti, Aragon-Alegro, de Mendonça, 2010).

Os principais sintomas da intoxicação são náuseas, vômitos, cólicas abdominais, diarreia, sudorese, dores de cabeça e, em alguns casos, quadros febris ou de hipotermia. Em uma compilação realizada com pacientes acometidos por intoxicação estafilocócica, observou-se que o sintoma mais recorrente foi vômito (82%), seguido de náusea (74%), diarreia aquosa (68%) e dores abdominais (64%) (Seo, Bohach, 2007). O período de incubação varia de 30 minutos a 8 horas, sendo em média de 2 h após a ingestão do alimento contaminado, com cura espontânea após 24 h (Dinges, Orwin, Schlievert, 2000; Le Loir et al., 2003). A taxa de letalidade é muito baixa, sendo mais preocupante quando há o acometimento de indivíduos idosos e crianças, devido à possível ocorrência de quadros de desidratação severa (Balaban, Rasooly, 2000).

Considerando os membros do gênero *Staphylococcus*, *S. aureus* é a espécie mais relacionada a surtos de intoxicação alimentar (De Buyser, Dufour, Maire, Lafarge, 2001) e o principal alvo de estudos desenvolvidos em alimentos, sendo conseqüentemente o principal foco da discussão abordada nesta revisão. Como *S. aureus* possui capacidade de colonizar a cavidade oronasal de humanos e animais, além de também estar presente em pele e pêlos, esse micro-organismo pode ser facilmente transferido aos alimentos. Estima-se que 20 a 50% de humanos adultos saudáveis sejam portadores assintomáticos, e por estas razões, os manipuladores de alimentos constituem o veículo de contaminação mais frequente deste micro-organismo (Le Loir et al., 2003). Além disso, por ser o principal agente causador de mastite em rebanhos leiteiros, *S. aureus* pode ser encontrado com facilidade em produtos lácteos, principalmente derivados de leite cru (Annemuller, Lämmler, Zschöck, 1999; Buzzola et al., 2001; Jorgensen et al., 2005; Lim et al., 2004; Sommerhäuser et al., 2003; Zadoks et al., 2002). Devido à sua capacidade de formar biofilmes e resistir à dessecação, a persistência de *S. aureus* nos equipamentos e utensílios utilizados na indústria alimentícia constitui também uma importante fonte de

contaminação (Bergdoll et al., 2006). Assim, uma vez presente e em condições que propiciem a sua multiplicação, *S. aureus* é capaz de produzir enterotoxinas, que ao atingirem níveis suficientes, podem determinar o surgimento dos distúrbios gastrintestinais associados com a intoxicação alimentar estafilocócica.

2.1. Impacto dos fatores intrínsecos e extrínsecos dos alimentos na multiplicação de *S. aureus* e produção de enterotoxinas

A versatilidade nutricional e a capacidade de resistirem a diferentes condições ambientais determinam a facilidade com que *S. aureus* é capaz de se multiplicar em uma ampla variedade de alimentos (Carmo et al., 2002; Le Loir et al., 2003). A multiplicação de *S. aureus* e a produção de enterotoxinas estão geralmente associadas, apesar de Wallin-Carlquist, Márta, Borch, Rådström (2010) terem demonstrado que o padrão de expressão e formação de enterotoxina A (SEA) em presunto cozido foi significativamente diverso daquele observado durante o cultivo em meio líquido. Esses autores verificaram um pico de expressão de SEA após 3-4 h do início da multiplicação bacteriana em meio de cultura, enquanto que nos produtos cárneos testados, a expressão de SEA estendeu-se durante todo o período de incubação, sugerindo que a produção de enterotoxina pode ocorrer de forma independente da fase de aumento exponencial da população bacteriana.

Em geral, estafilococos são micro-organismos mesófilos com temperatura ótima de multiplicação entre 35-37 °C, sendo também considerada ótima para a formação de enterotoxinas. No entanto, *S. aureus* é capaz de se multiplicar em uma faixa de temperatura que compreende 6-48 °C, enquanto que a formação de enterotoxinas pode ocorrer de forma marginal entre 10-45 °C (Bergdoll et al., 2006; Cretenet, Even, Le Loir, 2011; Schelin, Wallin-Carlquist, Thorup Cohn, Lindqvist, Barker, 2011) (Tabela 2). O congelamento e o descongelamento exercem pouco efeito sobre a viabilidade de *S. aureus*, apesar da demonstração da redução de sua população em produtos cárneos

expostos à temperaturas de subcongelamento (Demchick, Palumbo, Smith, 1982). No entanto, a refrigeração continua sendo a maneira mais eficaz de reduzir a multiplicação deste micro-organismo nos alimentos passíveis de contaminação.

S. aureus é capaz de se desenvolver em ampla faixa de pH, sendo os valores em torno da neutralidade (pH 7 a 7,5) considerados ótimos para a multiplicação e produção de enterotoxinas em alimentos (Tabela 2). No entanto, o pH ótimo no qual uma cepa é capaz de se multiplicar e produzir toxinas é afetado por outras condições do ambiente, como temperatura e disponibilidade de oxigênio (Bergdoll et al., 2006). Ainda assim, a taxa em que ocorre a acidificação e a natureza do ácido em questão interferem na dinâmica da população de *S. aureus* presente nos alimentos (Domenech et al., 1992; Minor, Marth, 1970). Em queijos, foi demonstrado que *S. aureus* é capaz de se multiplicar durante as primeiras etapas de produção, mesmo na presença de bactérias ácido lácticas (BAL), e que o valor de pH atingido nas primeiras horas de maturação exerce papel determinante na inibição desse desenvolvimento (Delbes, Alomar, Chougui, Martin, Montel, 2006). Nesse contexto, a multiplicação e produção de enterotoxinas podem ser favorecidas pelas condições de aerobiose e pH elevado mantidas na superfície do queijo, em comparação com aquelas encontradas no interior do alimento (Cretenet et al., 2011).

Tabela 2. Principais fatores que interferem na multiplicação e formação de enterotoxinas por *S. aureus* em alimentos (Modificado de Schelin et al., 2011).

Fator	Crescimento ótimo	Limites para o crescimento	Produção ótima de enterotoxinas	Limites para produção de enterotoxinas
Temperatura	35-41 °C	6-48 °C	34-40 °C	10-45 °C
pH	6-7	4-10	7-8	5-9.6
a_w	0,99	0,83 ≥ 0,99	0,99	0,86 ≥ 0,99
NaCl	0%	0-20%	0%	12%
Disponibilidade de O ₂	Aerobiose	Anaerobiose-aerobiose	Aerobiose	Anaerobiose-aerobiose

Quando comparado com os demais patógenos de origem alimentar, *S. aureus* pode se multiplicar e produzir enterotoxinas em uma ampla faixa de atividade de água (a_w), sendo considerada ótima quando $a_w > 0,99$ (Tabela 2). Assim como o pH, o efeito da a_w sobre *S. aureus* e suas enterotoxinas não ocorre de forma isolada, e é dependente dos demais parâmetros aos quais esse micro-organismo está submetido, bem como da natureza do soluto presente (Bergdoll et al., 2006). Devido à sua capacidade de resistir à dessecação, *S. aureus* é encontrado em alimentos com baixa a_w , havendo inclusive relatos de surto de intoxicação alimentar causado pela ingestão de leite em pó contaminado (Asao et al., 2003). Ainda, estudos demonstraram que a redução gradual da a_w afetou de forma moderada a formação de SEA e enterotoxina H (SEH), enquanto que a produção de enterotoxina B (SEB) foi drasticamente reduzida em condições de baixa a_w (Sakai et al., 2008).

De maneira geral, os micro-organismos do gênero *Staphylococcus* podem ser considerados halotolerantes, por serem capazes de suportar concentrações de NaCl que variam de 2,5% a 20% (Tabela 2). Essa característica confere uma importante vantagem competitiva à *S. aureus* frente aos demais patógenos, podendo inclusive explicar o grande envolvimento deste micro-organismo em intoxicações alimentares (Gómez-Lucía et al., 1992; Notermans, Heuvelman, 1983). Além da capacidade de se multiplicar nestas condições, a produção de enterotoxinas pode ocorrer em concentrações de NaCl de até 10%, o que determina que alimentos curados também podem ser implicados em intoxicações alimentares (de Santana et al., 2010).

S. aureus é tolerante à presença de O_2 , devido à capacidade de degradação dos radicais livres pela enzima catalase, sendo considerado uma bactéria anaeróbia facultativa (Tabela 2). Em cultivo laboratorial sob condições ótimas, o tempo de geração de *S. aureus* em anaerobiose é cerca de duas vezes maior do que em aerobiose. Da mesma forma, a produção de enterotoxinas por *S. aureus* submetidos à condições

aeróbicas é significativamente maior do que a quantidade produzida sob anaerobiose no mesmo período (Belay, Rasooly, 2002).

A capacidade de multiplicação e produção de enterotoxinas por *S. aureus* é drasticamente afetada pela presença de outros micro-organismos, exceto em situações em que a sua população inicial é significativamente maior do que as demais populações bacterianas (Le Loir et al., 2003). Esse efeito da competição microbiana pode ser observado principalmente em alimentos cárneos fermentados, queijos e leite cru (Charlier, Cretenet, Even, Le Loir, 2009; Even et al., 2009). Nestes alimentos, a inibição pode ser explicada pela ocorrência de uma microbiota autóctone que apresenta atividade antagonista, constituída essencialmente por BAL (Charlier et al., 2009).

2.2. Prevalência de surtos de intoxicação alimentar estafilocócica no Brasil e no mundo

De maneira geral, a intoxicação alimentar estafilocócica é considerada uma doença subnotificada. Devido ao caráter autolimitante da doença, que apresenta sintomatologia branda e de curta duração, os casos e surtos desse tipo de intoxicação raramente levam as pessoas envolvidas a procurarem tratamento clínico, fazendo com que o índice de hospitalização, e conseqüente notificação, seja relativamente baixo. No Brasil, os dados oficiais são ainda mais limitados, pois além de ser considerada uma doença de notificação não compulsória, estudos que determinem a prevalência dos variados tipos de enterotoxinas e o caráter endêmico e/ou epidêmico da doença ainda são considerados escassos em algumas regiões do país. Além disso, o frequente erro diagnóstico dos profissionais de saúde, equívocos na coleta das amostras para testes laboratoriais e as investigações epidemiológicas inadequadas ou inconclusivas acabam por agravar este panorama (Dias, Leal Bernardes, Zuccoli, 2011).

Do ponto de vista epidemiológico, surtos alimentares são definidos como sendo a ocorrência de dois ou mais casos de uma doença, com o mesmo quadro clínico, resultante da ingestão de um alimento em comum (Abgrall, Misner, 1998). Usualmente, grande parte dos surtos de intoxicação alimentar estafilocócica são decorrentes de falhas nas práticas higiênico-sanitárias durante o processamento, cozimento ou distribuição dos alimentos. Além disso, cinco fatores são determinantes para a ocorrência de um surto de intoxicação alimentar estafilocócica: i) a existência de um veículo carreador de cepas de estafilococos produtoras de enterotoxinas; ii) a transferência destas cepas para o alimento; iii) a presença de um alimento cujas características intrínsecas ofereçam condições necessárias à multiplicação das cepas; iv) manutenção de uma temperatura favorável à multiplicação e produção de enterotoxinas pelas cepas e v) ingestão do alimento contendo uma quantidade de enterotoxinas passíveis de induzir o surgimento dos sintomas (Hennekinne et al., 2010).

As enterotoxinas clássicas são responsáveis pela ocorrência de 95% dos surtos de intoxicação alimentar, sendo SEA e SEC as mais comumente encontradas (Al-Tarazi, Albetar, Alaboudi, 2009; Balaban et al., 2000; Normanno et al., 2005; Oh et al., 2007; Tamarapu, McKillip, Drake, 2001; Tsen et al., 1998). Esta frequência de identificação pode estar diretamente relacionada aos métodos disponíveis para a detecção de EE, os quais detectam somente SEA a SEE (Chiang et al., 2008).

Historicamente, o primeiro surto de intoxicação alimentar envolvendo estafilococos foi descrito em 1884, no estado de Michigan, Estados Unidos, e foi atribuído ao consumo de queijo tipo *cheddar* contaminado. No entanto, o papel de estafilococos como causador de doenças através da ingestão de alimentos contaminados foi confirmado somente 30 anos mais tarde, quando Barber (1914) avaliou a relação entre o surgimento de sintomas como vômitos, diarreias e dores abdominais com a ingestão de leite contaminado. Neste relato, Barber realizou o isolamento de colônias de *Staphylococcus* de leite não-refrigerado, possivelmente oriundo de animal com mastite, e que quando reinoculadas em

leite estéril, seguido de incubação a 37 °C por 8 h e administração via oral, eram responsáveis pelo ressurgimento dos sintomas anteriormente observados. A primeira demonstração da toxina estafilocócica em alimentos foi realizada em 1929, pelo Dr. Gail M. Dack, em estudo que avaliou bolos recheados com creme, responsáveis pela intoxicação de 11 pessoas. Neste estudo, Dack isolou colônias de *Staphylococcus* a partir dos bolos, em seguida realizou um novo cultivo em meio de cultura e, após a centrifugação e retirada das células, constatou que o sobrenadante obtido apresentou a capacidade de induzir os mesmos sintomas observados nos pacientes que ingeriram o bolo. Nesta ocasião, a substância recém-descoberta foi denominada “enterotoxina” devido à sua capacidade de atuar no trato digestório (Bergdoll et al., 2006).

Desde o reconhecimento da sua etiologia, a intoxicação alimentar estafilocócica se tornou uma das principais causas de doenças alimentares em diversas partes do mundo. Nos Estados Unidos, durante os anos de 1960 a 1970, *S. aureus* foi considerado como o agente patogênico mais prevalente nos casos de intoxicações alimentares. Porém, este panorama foi alterado, devido à implantação de medidas de prevenção e controle deste patógeno no preparo e manipulação de alimentos, apesar de que ainda seja esperada a ocorrência de surtos ocasionais em ambiente familiar, que frequentemente não são comunicados às autoridades sanitárias (Bergdoll et al., 2006). Ainda nos Estados Unidos, os dados laboratoriais sobre a investigação de casos de doenças alimentares são comunicados às autoridades sanitárias por meio de banco de dados específicos para diversos patógenos, como o *Foodborne Disease Outbreak Surveillance System*, utilizado para o armazenamento de dados sobre a ocorrência de *S. aureus* (Scallan et al., 2011).

Na União Européia, diversos países já demonstraram a ocorrência de surtos causados por enterotoxinas estafilocócicas (Schmid et al., 2009; Wattinger, Stephan, Layer, Johler, 2012). No Reino Unido, o panorama é similar àquele encontrado nos Estados Unidos, com diminuição progressiva no número de surtos causados por EE (Gormley et al., 2011; Wieneke, Roberts, Gilbert, 1993).

Na França, entre 2006 e 2009, 3.127 surtos de intoxicação alimentar foram reportados às autoridades sanitárias, com acometimento de 33.404 pessoas, dentre as quais 15 foram a óbito. *S. aureus* foi o segundo agente mais prevalente nestes surtos (16%), ficando atrás somente de *Salmonella* spp.; porém foi considerado o agente mais frequentemente associado aos casos suspeitos e não-confirmados (37,9%) (Delmas et al., 2010). Já em 2009, as enterotoxinas estafilocócicas foram os agentes mais frequentemente incriminados ou suspeitos na ocorrência de 1.255 surtos. Em ambos os relatos, os locais de origem dos surtos de intoxicação estafilocócica foram predominantemente ambiente familiar e estabelecimentos comerciais, enquanto que os alimentos mais associados foram refeições prontas para o consumo e derivados lácteos. Em estudo realizado com dados de investigações epidemiológicas na França entre os anos de 1988-1997, foi constatada a grande participação dos derivados lácteos nos surtos de intoxicações alimentares causadas por *S. aureus* (De Buyser et al., 2001). Recentemente, uma investigação epidemiológica demonstrou, com o auxílio de técnicas moleculares, a primeira ocorrência de um surto alimentar causado pela enterotoxina E, veiculada através de queijos produzidos com leite cru (Ostyn et al., 2010). O número mais elevado de surtos ocorridos na França em relação aos demais países da Europa pode ser explicado, em parte, pela obrigatoriedade em notificar a ocorrência de casos de intoxicação alimentar e também pela introdução do *software WinTiac*, como ferramenta de gestão desses agravos pelos sistemas de saúde franceses.

No continente asiático, a ocorrência de surtos alimentares por toxinas estafilocócicas foi documentada em diversos países. Na China, acredita-se que *S. aureus* seja responsável pela ocorrência de 25% dos casos de intoxicação alimentar, chegando a 40% em algumas áreas do país (Tang et al., 2011). Entre 2003 e 2007, 94 surtos causados por enterotoxinas estafilocócicas foram notificados às autoridades sanitárias chinesas, com acometimento de 2.223 pessoas (Yan et al., 2012). Já na Coreia do Sul, *S. aureus* foi considerado o terceiro patógeno mais frequentemente associado a surtos de

origem alimentar ocorridos entre 1996 e 2006 (Cha et al., 2006). Ainda na Coréia do Sul, no período de 2002 a 2006, outro estudo relatou que *S. aureus* esteve relacionado com a ocorrência de 81,5% dos casos e surtos de intoxicação alimentar, nos quais o agente foi efetivamente confirmado (Lee, Lee, Kim, Park, 2009). Na Índia, *S. aureus* está envolvido em surtos de intoxicação alimentar principalmente relacionados ao consumo de carnes e peixes; porém, o número de surtos registrados é possivelmente muito menor do que o real, devido à falta de infraestrutura nas investigações epidemiológicas (Vemula, Kumar, Polasa, 2012). Ainda, a associação das enterotoxinas SEB e SED causou um surto alimentar no estado de Madhya Pradesh, na Índia, com acometimento de 100 crianças, após a ingestão de bolinhos de batata (Nema, Agrawal, Kamboj, Goel, Singh, 2007). Por outro lado, a ocorrência de surtos alimentares estafilocócicos no Japão apresenta uma diminuição progressiva (Anonymous, 2001). Os alimentos frequentemente implicados nestes surtos eram bolinhos de arroz (em japonês: *onigiri*), anteriormente preparados manualmente, e que hoje contam com um processo automatizado. No entanto, um surto alimentar de proporções muito elevadas ocorreu na cidade de Osaka, em 2000, com acometimento de 13.420 pessoas, devido ao consumo de leite em pó contaminado com pequenas quantidades de SEA e SEH, apesar do micro-organismo estar ausente nos lotes analisados (Asao et al., 2003; Ikeda, Tamate, Yamaguchi, Makino, 2005).

Já nos países em desenvolvimento, a ocorrência de surtos de intoxicação alimentar estafilocócica é pouco documentada, apesar de ser possivelmente uma das doenças de origem alimentar mais frequentes. Em países da América Latina, as autoridades sanitárias vêm reconhecendo o impacto da ocorrência de intoxicações alimentares, o que tem justificado o aumento nos esforços para a implantação de sistema de vigilância epidemiológica eficaz (Anonymous, 1997). No México e na Argentina, surtos relacionados com a presença de *S. aureus* enterotoxigênicos já foram relatados (Brizzio, Tedeschi, Zalazar, 2011; Ibarra-Velázquez et al., 2011; López et al., 2008). No Paraguai, um surto de intoxicação alimentar causado pela ingestão de leite UHT recontaminado

após o processamento térmico com *S. aureus* produtor de SEC e SED foi divulgado recentemente, abrangendo três cidades distintas e afetando mais de 400 pessoas. Neste surto, foi possível verificar a similaridade genética, a capacidade de produção de enterotoxinas *in vitro* e a presença dos genes correspondentes nas cepas de *S. aureus* isoladas dos indivíduos acometidos, do alimento incriminado e do funcionário responsável pela origem do surto (Weiler et al., 2011).

Os relatos sobre a ocorrência de *Staphylococcus* spp. em alimentos em âmbito nacional iniciaram na década de 1970, com o início da cooperação entre o Prof. Merlin S. Bergdoll (1916-1998), do *Food Research Institute*, com pesquisadores brasileiros. No Brasil, a Secretaria de Vigilância em Saúde, do Ministério da Saúde, coordena uma rede formada por Laboratórios Centrais de Saúde Pública (LACEN), presentes em cada unidade da Federação. Na ocorrência de um surtos de toxinfecção alimentar, os LACEN atuam em conjunto com os Laboratórios de Referência Nacional (LRN) e Regional (LRR), e também contam com o auxílio de Centros Colaboradores. A recepção de material clínico e bromatológico para análises de surto de toxinfecções alimentares é realizada no LACEN, enquanto que as análises pontuais, programadas e que necessitam de alta complexidade ocorrem nos LRN. As cepas de estafilococos envolvidas em intoxicações alimentares são enviadas ao Laboratório de Enterotoxinas da Fundação Ezequiel Dias, em Belo Horizonte/MG, onde são analisadas quanto à capacidade de produção de enterotoxinas em um protocolo padronizado.

No Brasil, estudos relatam a ocorrência de estafilococos em surtos de intoxicações alimentares, relacionados principalmente à leite cru e queijos frescos (Anuniação, Linardi, Carmo, Bergdoll, 1994; Carmo et al., 2002; Pereira, Do Carmo, dos Santos, Pereira, Bergdoll, 1996; Sabioni, Hirooka, de Souza, 1988; Veras et al., 2008). SEA e SEB foram as enterotoxinas mais frequentemente encontradas nos estudos citados. Além disso, foi demonstrada a participação de estafilococos coagulase-negativos na ocorrência destes surtos (Anuniação et al., 1994; Veras et al., 2008). No Brasil, os surtos de

intoxicação alimentar causados por derivados lácteos contaminados com EE podem estar relacionados à diversos fatores, como: i) elevada prevalência deste micro-organismo como agente causador de mastite subclínica (Beloti, Müller, Freitas, Mettifogo, 1997; dos Santos, Pedroso, Guirro, 2010; Langoni, Pinto, Domingues, Listoni, 1991; Lopes et al., 1990; Martins, Da Silva, Nakazato, Dutra, De Almeida Filho, 2010; Mota et al., 2012); ii) hábito de consumir queijos produzidos artesanalmente e/ou leite cru comercializado clandestinamente (Badini, Nader Filho, Amaral, Germano, 1996; Lucci et al., 2011) e iii) qualidade microbiológica insatisfatória desses produtos (Ortolani, Yamazi, Moraes, Viçosa, Nero, 2010).

3. Enterotoxinas estafilocócicas

3.1. Características gerais

Enterotoxinas estafilocócicas (EE) são proteínas extracelulares de baixo peso molecular (25 a 30 KDa), hidrossolúveis, cuja composição de aminoácidos, estrutura molecular e mecanismos de ação são semelhantes entre si, além de possuírem propriedades imunológicas distintas. São resistentes a temperaturas elevadas e à ação de diversas enzimas proteolíticas, características que permitem explicar a capacidade de permanecerem ativas após a sua ingestão, bem como a permanência em determinados alimentos (Thomas, Chou, Dauwalder, Lina, 2007).

Até o presente momento, são conhecidas 22 diferentes EE, excluindo-se as variantes moleculares, as quais são nomeadas com letras do alfabeto romano na ordem cronológica em que foram descritas e de acordo com a sua capacidade de apresentar êmese em primatas quando administradas via oral (Lina et al., 2004; Thomas et al., 2007). Sendo assim, as EE incluem: (i) as enterotoxinas clássicas SEA, SEB, SEC, SED, SEE, que foram descritas em cepas de *S. aureus* recuperadas de surtos de intoxicação

alimentar e classificadas em diferentes grupos sorológicos; (ii) as novas toxinas (SEG, SEH, SEI, SER, SES, SET); e (iii) as *staphylococcal enterotoxin-like* ou EEI, assim denominadas por não apresentarem capacidade emética ou por ainda não terem sido testadas em modelos animais (SEJ, SEK, SEL, SEM, SEN, SEO, SEP, SEQ, SEU, SEU₂, SEM) (Argudin, Mendoza, Rodicio, 2010; Hennekinne, De Buyser, Dragacci, 2012).

As EE pertencem à grande família de superantígenos bacterianos, que incluem também as exotoxinas pirogênicas estreptocócicas e a toxina da síndrome do choque tóxico (TSS). Ao contrário dos antígenos comuns, os superantígenos não sofrem processamento pelas células apresentadoras de antígenos (APC), e se ligam diretamente às moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) classe II, ativando de forma inespecífica uma grande quantidade de células T. Normalmente, a interação com o receptor de células T (TCR) ocorre na região variável da cadeia β , exceto por SEH que interage com a região variável α (Johler, Stephan, 2010), levando à ativação dos linfócitos T acompanhada por uma proliferação e liberação massiva de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias, que podem determinar o surgimento de um quadro característico de choque tóxico (Figura 1) (Argudin et al., 2010; Balaban et al., 2000; Dinges et al., 2000; Thomas et al., 2007).

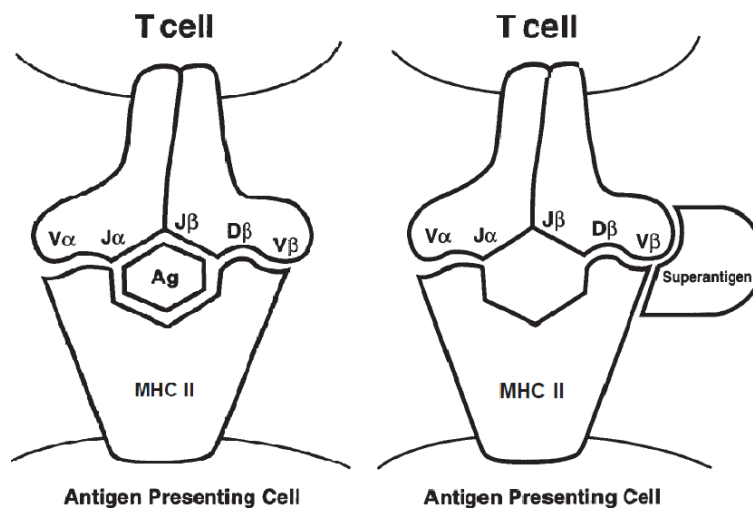


Figura 1. Representação esquemática da ativação de células T por antígenos (Ag) convencionalmente processados e por superantígenos (Manders, 1998).

Apesar do modo de ação dos superantígenos ser bastante conhecido, o mecanismo que leva ao surgimento da êmese pela atividade das EE ainda não está totalmente esclarecido, pois os resultados obtidos até o presente momento são limitados e controversos. Acredita-se que ambas as atividades apresentam correlação, uma vez que a perda da atividade superantigênica em cepas mutantes também resultou na perda da capacidade de induzir êmese (Harris et al., 1993; Hennekinne et al., 2012). Além disso, a capacidade das EE em induzir êmese pode apresentar intensidades variadas. Estudos demonstraram que SE/L e SE/Q não induzem à êmese, enquanto que SEI apresenta baixa capacidade emética, pois essas toxinas não apresentam o laço dissulfídico encontrado na porção N-terminal das demais EE (Ono et al., 2008). Apesar de não ser um requisito indispensável, a presença deste laço dissulfídico é capaz de estabilizar a proteína em uma conformação específica para que ocorra a êmese (Hovde et al., 1994).

As estruturas tridimensionais de dez superantígenos estafilocócicos foram determinadas por cristalografia, revelando características altamente conservadas entre essas proteínas (Mitchell, Levitt, Schlievert, Ohlendorf, 2000). De maneira geral, são proteínas elipsoidais compactas com dois domínios desiguais, domínio A e B, separados por uma cavidade rasa, cujas estruturas secundárias são majoritariamente representadas por uma mistura de α -hélices e folhas- β . O domínio A, que abrange a extremidade C-terminal e uma região da extremidade N-terminal, é constituído de quatro ou cinco folhas- β compactadas e dispostas contra uma região altamente conservada de α -hélices. Já o domínio menor, denominado B, apresenta um arranjo de folhas- β anti-paralelas com topologia de chave grega, observado também em outras toxinas, como a nuclease estafilocócica e a enterotoxina colérica (Argudin et al., 2010; Mitchell et al., 2000; Thomas et al., 2007). É ainda na parte superior do domínio B que está presente o laço dissulfídico, uma característica comum entre as EE que parece estar relacionada com a sua capacidade emética. A interface entre os dois domínios é dada por uma cavidade curta na parte superior e por um sulco profundo que se estende ao longo de todo o verso da

molécula, enquanto que a estabilização ocorre através da presença de uma ponte oriunda da região N-terminal que se estende até o topo da extremidade C-terminal da molécula (Figura 2) (Mitchell et al., 2000).

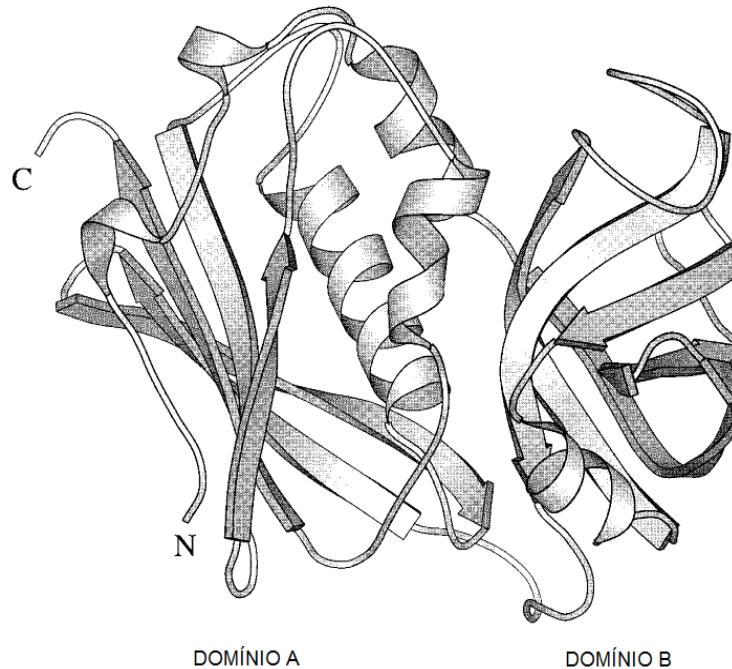


Figura 2. Representação esquemática da estrutura secundária de SEC₃, exibindo os domínios A e B da proteína (Dinges et al., 2000).

Ao contrário de outras toxinas bacterianas, não existem receptores ou células específicas no trato digestório aos quais ocorre a ligação das EE. Sendo assim, acredita-se que as EE conseguem penetrar pela parede intestinal e ativar o sistema imunológico local, causando a liberação de diversos mediadores inflamatórios, bem como atingir a circulação sanguínea e se disseminar pelo corpo, onde podem induzir ao choque tóxico por atuarem como superantígenos. No intestino, as EE estimulam o nervo vago através de um estímulo aferente, em que o sinal é transmitido ao centro do vômito no cérebro, induzindo à êmese. Já os episódios de diarreia associados com a intoxicação alimentar estafilocócica podem ter origem na inibição da reabsorção de eletrólitos e água no intestino delgado (Sheehan, Jervis, Takeuchi, Sprinz, 1970; Thomas et al., 2007).

Estudos em pacientes acometidos por intoxicação estafilocócica demonstram que os danos causados pelas enterotoxinas ocorrem principalmente no estômago e no intestino delgado, onde é observada a presença de hiperemia irregular da mucosa, edema circunscrito, irritação muscular, erosão, petéquias e exsudato purulento. Além disso, observam-se criptas intestinais alongadas, rompimento ou perda da borda em escova, acompanhado de um infiltrado extenso de células polimorfonucleares e macrófagos na lâmina própria.

3.2. Determinantes genéticos e regulação da expressão das enterotoxinas estafilocócicas

Os genes que codificam as EE podem apresentar particularidades quanto à localização, expressão e produção. De forma geral, os genes de EE estão localizados em elementos genéticos móveis, como plasmídeos, profagos, ilhas de patogenicidade, ilhas genômicas ou em regiões flanqueadoras de cassetes cromossômicos (Argudin et al., 2010; Cretenet et al., 2011; Johler et al., 2010; Le Loir et al., 2003) (Tabela 3).

Os genes *sea*, *selk*, *selp* e *selq* são carregados por profagos que pertencem à família *Siphoviridae*, podendo ocorrer de forma simultânea ou isolada na mesma partícula viral (Argudin et al., 2010; Schad, Papageorgiou, Svensson, Acharya, 1997). No que se refere à genes de enterotoxinas carregados por plasmídeo, pode-se citar o plasmídeo pIB485, que contém *sed* e *selj*, e foi o primeiro a ser descrito na espécie *S. aureus* (Zhang, Iandolo, Stewart, 1998). O gene *ser* foi posteriormente localizado em outro plasmídeo, denominado pF5, juntamente com *selj*, *ses* e *set* (Omoe, Hu, Takahashi-Omoe, Nakane, Shinagawa, 2003; Ono et al., 2008). O gene *seb* está situado no cromossomo de certos isolados (Shafer, Iandolo, 1977), porém também pode estar presente em plasmídeos (Shalita, Hertman, Sarid, 1977). De forma similar, *sec* pode estar localizado no cromossomo ou em plasmídeos (Fitzgerald et al., 2001).

Quanto às ilhas de patogenicidade de *S. aureus*, denominadas genericamente de *Staphylococcus aureus Pathogenicity Islands* (SaPI), são estruturas cuja organização é altamente conservada, que ocupam locais específicos no cromossomo bacteriano (*att_B*) na mesma orientação e apresentam capacidade de excisão, replicação e encapsulamento frequentes, apresentando assim uma altíssima taxa de transferência. Dentre os genes de EE carregados por SaPI incluem-se *selk*, *selq*, *seli*, *selk*, *sec₃*, *seb* (Novick, 2003a).

Já o termo *vSa* refere-se às ilhas genômicas presentes exclusivamente em *S. aureus*, que não apresentam características de profago e/ou cassete cromossomal e estão inseridas em *loci* específicos do cromossomo. As *vSa* contêm aglomerados de genes (*gene clusters*), que codificam para diversas enterotoxinas e outros fatores de virulência, como o *enterotoxin gene cluster* (*egc*). Por fim, o gene *seh* se encontra em proximidade ao *Staphylococcal Cassette Chromosome* (SCC), estrutura que contém o gene codificante de proteínas de resistência à meticilina em *S. aureus* (*mecA*) (Baba et al., 2002).

O *egc* foi descrito pela primeira vez em 2001, por dois grupos de pesquisa distintos de forma quase simultânea, e compreendia inicialmente cinco genes de enterotoxinas (*selo*, *selm*, *seli*, *seln* e *seg*) e dois pseudogenes (*Ψent1*, *Ψent2*) (Jarraud et al., 2001; Monday, Bohach, 2001). Posteriormente, dois polimorfismos foram descritos nestas sequências, resultantes da inserção de 15 nucleotídeos e uma deleção que retirava o códon de parada na sequência original correspondente ao pseudogene *Ψent1*, levando ao surgimento do gene *selu*, além de variações menores nas demais sequências que compõem o *cluster* (Letertre, Perelle, Dilasser, Fach, 2003b). Ainda, outra variação foi posteriormente descrita, na qual se determinava o surgimento de outros dois genes, *selv* e *selu2*, resultantes de eventos de recombinação entre os genes *selm* e *seli* e da deleção de uma única base entre as sequências de *Ψent1* e *Ψent2* (Thomas et al., 2006). Desta maneira, em ordem transcricional, as 4 variações descritas do *egc* compreendem: i) *egc1* (*selo*, *selm*, *seli*, *Ψent1*, *Ψent2*, *seln*, *seg*); ii) *egc2* (*selo*, *selm*, *seli*, *selu*, *seln*, *seg*); iii)

egc3 (*selo_v*, *selm_v*, *seli_v*, *selu_v*, *seln_v*, *seg_v*) e iv) *egc4* (*selo*, *selv*, *selu2*, *seln*, *seg*) (Collery, Smyth, Tumilty, Twohig, Smyth, 2009; Schelin et al., 2011; Zhang, Shen, Dong, 2013). O *egc* pode ainda apresentar-se de maneira incompleta, com ausência de um ou mais genes originalmente presentes no *egc1*, e desta maneira são considerados intermediários evolutivos do *egc* (Thomas et al., 2006). Ainda assim, devido ao fato de que cada um dos três grupos principais de homologia de EE e EEI contém enterotoxinas codificadas pelos genes presentes no *egc*, é proposto que este *cluster* atua como um reservatório de genes de enterotoxinas (Jarraud et al., 2001; Schelin et al., 2011; Thomas et al., 2007).

Tabela 3. Enterotoxinas estafilocócicas e seus determinantes genéticos (Modificado de Schelin et al., 2011).

Enterotoxina	Massa molar (Da)	Determinante genético	Ação superantigênica	Ação emética	Referência
SEA	27100	Profago	+	+	Borst, Betley (1994) Betley, Mekalanos (1985) Shafer et al. (1977) Shalita et al. (1977)
SEB	28.336	SaPI, plasmídeo	+	+	Altboum, Hertman, Sarid (1985)
SEC ₁₋₂₋₃	27.500	SaPI, plasmídeo	+	+	Altboum et al. (1985) Fitzgerald et al. (2001)
SED	26.360	Plasmídeo	+	+	Bayles, Iandolo (1989)
SEE	26.425	Profago	+	+	Couch, Soltis, Betley (1988) Jarraud et al. (2001)
SEIG	27.043	<i>egc</i>	+	+	Munson, Tremaine, Betley, Welch (1998)
SEH	25.210	Transposon	+	+	Noto, Archer (2006) Jarraud et al. (2001)
SEI	24.298	<i>egc</i>	+	+	Munson et al. (1998)
SEIJ	28.565	Plasmídeo	+	d	Zhang et al. (1998)
SEK	25.539	SaPI	+	d	Orwin, Leung, Donahue, Novick, Schlievert (2001)
SEIL	24.593	SaPI	+	-	Fitzgerald et al. (2001)
SEIM	24.842	<i>egc</i>	+	d	
SEIN	26.067	<i>egc</i>	+	d	Jarraud et al. (2001)
SEIO	26.777	<i>egc</i>	+	d	
SEIP	26.608	Profago	+	d	Omoe et al. (2005)
SEIQ	25.076	SaPI	+	-	Jarraud et al. (2002)
SER	27.049	Plasmídeo	+	+	Omoe et al. (2003)
SES	26.217	Plasmídeo	+	+	Ono et al. (2008)
SET	22.614	Plasmídeo	+	+	Ono et al. (2008)
SEIU	27.100	<i>egc</i>	+	d	Letertre et al. (2003b)
SEIU ₂	26.672	<i>egc</i>	+	d	
SEIV	24.997	<i>egc</i>	+	d	Thomas et al. (2006)

d: efeito emético desconhecido.

A expressão gênica de algumas enterotoxinas é influenciada pelo sistema regulatório global *accessory gene regulator (agr)* (Novick, 2003b), além de também sofrer influência do fator σ alternativo, *sigB* (Pané-Farré, Jonas, Förstner, Engelmann, Hecker, 2006). O sistema *agr* é um sistema de transdução de sinal, ubiquitário no gênero *Staphylococcus*, e que permite a modulação da expressão de diversos genes de acordo com a densidade celular, em um mecanismo denominado *quorum sensing* (Thoendel, Kavanaugh, Flack, Horswill, 2011). Durante o início da infecção por *S. aureus*, a atividade do *agr* é baixa, ocorrendo assim a expressão de proteínas de superfície, que auxiliam no processo de colonização. Com o progresso da infecção, *agr* inicia sua atividade, suprimindo a expressão das adesinas e iniciando a produção de exotoxinas, como as enterotoxinas e exoproteínas degradativas, atuando assim como um *regulon* (Arvidson, Tegmark, 2001; Cheung, Bayer, Zhang, Gresham, Xiong, 2004; Otto, 2001; Papakyriacou, Vaz, Simor, Louie, McGavin, 2000). Mutações naturais no *locus agr* reduzem a persistência do micro-organismo em infecções e diminuem a capacidade de síntese de exotoxinas, sugerindo que *agr* é, por si só, um importante fator de virulência de *S. aureus* (Yoon et al., 2007).

A produção de EE e das enzimas coagulase e termonuclease tem grande importância para a identificação de *S. aureus* isolados de alimentos, e por isso, as relações com o *locus agr* têm sido alvo de estudo. Outro aspecto muito importante na relação entre *locus agr* e *S. aureus* em alimentos diz respeito à capacidade de formar biofilmes em equipamentos e superfícies. Nesse ponto, cepas de *S. aureus* que expressam altos níveis de *agr* têm reduzida capacidade de formar biofilmes (Beenken et al., 2004; Boles, Horswill, 2008). Entretanto, Cafiso et al. (2007) observaram que cepas pertencentes ao grupo *agrII* tem alta capacidade de produção de biofilmes.

O polimorfismo na seqüência do peptídeo autoindutor (AIP) do sistema *agr* e no seu receptor resultam na formação de quatro grupos: I, II, III e IV (Chini, Dimitracopoulos, Spiliopoulou, 2006; Jarraud et al., 2000; Shopsin et al., 2003). Assim, Ji, Beavis, Novick

(1997) sugeriram que a hipervariabilidade do *locus agr* decorre do acúmulo de mutações pontuais. Além disso, sabe-se que o AIP de cepas pertencentes ao mesmo grupo *agr* ativam a resposta entre si, enquanto que, em cepas de grupos *agr* diferentes, os AIP competem entre si, podendo ocasionar a repressão do *locus agr* em cepas de grupos distintos (Ji et al., 1997). Ainda, sugere-se que a ocorrência de determinados grupos *agr* está relacionada com o surgimento de determinados quadros clínicos. Jarraud et al. (2002) relatam que cepas dos grupos *agrI* e *agrII* causam, preferencialmente, doenças mediadas por enterotoxinas, como a intoxicação alimentar, e que o grupo *agrIII* está envolvido com a síndrome do choque tóxico. Além disso, Jarraud et al. (2000) também descreveram que as cepas pertencentes ao grupo *agrIV* estão relacionadas com a produção de exotoxinas exfoliativas, envolvidas na síndrome da pele escaldada.

Os genes *seb* e *sec* estão sob o controle do sistema *agr* e a expressão destes genes é fortemente induzida durante a transição da fase exponencial para a fase estacionária da multiplicação bacteriana (Gaskill, Khan, 1988; Wright, Holland, 2003). Tseng, Zhang, Stewart (2004) descrevem que somente *sed* é regulada pelo *locus agr*, apesar de muitas vezes estar concomitantemente presente com *sej* no mesmo plasmídeo (Zhang et al., 1998). O gene *sea* é regulado independentemente da expressão de *agr* (Tremaine, Brockman, Betley, 1993).

Em estudo realizado por Derzelle, Dilasser, Duquenne, Deperrois (2009), a expressão de genes de enterotoxinas foi avaliada em função do ciclo de multiplicação bacteriana em 28 cepas de estafilococos, incluindo 7 cepas-referência e 21 isolados de surtos de intoxicação alimentar. Os resultados obtidos revelaram quatro perfis de expressão distintos: i) para os genes *sea*, *see*, *sej*, *sek*, *seq* e *sep* não houve alteração na abundância dos transcritos ao longo da curva de crescimento; ii) ligeira redução nos níveis dos transcritos de *seg*, *sei*, *sem*, *sen*, *seo* e *seu*; iii) indução drástica de *seb*, *sec* e *seh* ao final da fase exponencial e iv) pequeno aumento nos transcritos de *sed*, *ser* e *sel*

na fase pós-exponencial. Com base nesses resultados, é possível que grande parte dos genes de EEI não são controlados pelo sistema *agr*.

4. Métodos de enumeração e detecção de *S. aureus* em alimentos

A enumeração de *S. aureus* em alimentos é usualmente realizada com a utilização de métodos microbiológicos convencionais, que visam a enumeração direta de colônias desse micro-organismo em meios de cultura seletivos e diferenciais, como o ágar Baird-Parker (BPA) e o ágar Fibrinogênio Plasma de Coelho (RPFA). Uma etapa posterior ao isolamento é a identificação do potencial enterotoxigênico das colônias formadas, que são selecionadas por amostragem e submetidas a testes bioquímicos como coloração de Gram e avaliação da produção das enzimas catalase, coagulase e termonuclease (AOAC, 1995; ISO, 1999). O teste da produção de coagulase livre é considerado padrão para a identificação de *S. aureus* e o teste da termonuclease é usado como auxiliar na discriminação de *S. aureus* das demais espécies de estafilococos (Menzies, 1977). Além do papel de identificação, esses testes também são considerados como indicadores indiretos da capacidade de determinado isolado produzir enterotoxinas (Victor et al., 1969).

Durante muitos anos associou-se a capacidade de produzir coagulase e/ou termonuclease à produção de enterotoxinas apenas por *S. aureus*, o que determinou a padronização de protocolos direcionados para esse micro-organismo (da Silva et al., 2010; Downes, Ito, 2001). O conceito de intoxicação alimentar estafilocócica estritamente relacionada à *S. aureus* começou a sofrer alterações a partir da demonstração de produção de enterotoxinas por outras espécies coagulas positivas, como *S. hyicus* (Adesiyun et al., 1984) e *S. intermedius* (Hirooka et al., 1988), e até mesmo por espécies coagulase-negativas, como *S. epidermidis* (Breckinridge, Bergdoll, 1971). Isto sugere que a detecção e isolamento através de métodos convencionais de cultivo, seguido dos testes

de coagulase e/ou termonuclease, pode não ser suficiente para determinar o potencial enterotoxigênico dos isolados de *Staphylococcus* spp. presentes em alimentos (Sankaran, Leela, 1982). Apesar disso, a legislação brasileira ainda utiliza o número de estafilococos coagulase positiva como parâmetro microbiológico oficial para análise de alimentos, sem mencionar limites para a detecção de enterotoxinas (BRASIL, 2001).

Existem inúmeras inconveniências com o uso das técnicas clássicas de cultivo microbiano para detecção de ECP em alimentos, como o tempo requerido para análise, que pode variar de três a seis dias, dependendo das etapas confirmatórias adicionais. Ainda, alguns fatores podem contribuir para a ocorrência de resultados falso-negativos nas análises de ECP em alimentos por métodos de microbiologia clássica, como a presença de resíduos de antimicrobianos e a ausência ou número muito reduzido de células bacterianas viáveis, devido ao uso de tratamento térmico (Ahmadi, Rohani, Ayremlou, 2010).

Além disso, a metodologia utilizada na detecção de ECP em alimentos apresenta limitações, como a baixa seletividade e a ocorrência de resultados imprecisos, devido à necessidade de estimar a população de ECP com base na avaliação de uma amostragem das colônias obtidas (De Buyser, Audinet, Delbart, Maire, Françoise, 1998; Schoeller, Ingham, 2001). Recentemente, estudos demonstraram a relação entre a morfologia das colônias obtidas em três meios de cultura distintos (BPA, RPFA e Petrifilm™ Staph Express Count) com a produção de coagulase e termonuclease (Viçosa, Moraes, Yamazi, Nero, 2010), e também com a detecção de genes e produção de enterotoxinas (Zhang et al., 2012). Estes estudos sugerem que, ao utilizar BPA, as contagens de colônias típicas apresentam menores índices de correlação com as contagens de colônias coagulase e/ou termonuclease-positivas, bem como com os isolados produtores de enterotoxinas. No entanto, Zhang et al. (2012) não verificaram diferenças significativas entre as frequências de colônias típicas que apresentavam genes de EE obtidas nestes três meios de cultura.

Portanto, diante da necessidade de um método de detecção rápido e específico para este patógeno e suas enterotoxinas, têm-se verificado um aumento significativo no desenvolvimento de métodos moleculares, como a reação da polimerase em cadeia (do inglês: *Polymerase Chain Reaction*, PCR). Desenvolvida em 1985, esta técnica permite a amplificação exponencial de sequências de DNA, a fim de se obter milhões de cópias de segmentos específicos, através da ação da enzima *Taq* DNA polimerase e de oligonucleotídeos iniciadores (do inglês: *primers*). A PCR é usualmente realizada em um equipamento automatizado e computadorizado, denominado termociclador, que promove a alternância de temperaturas por determinados períodos de tempo, possibilitando a ocorrência de ciclos repetitivos de desnaturação e síntese de DNA (de Boer, Beumer, 1999; Malorny et al., 2003). A técnica de PCR apresenta diversas vantagens em relação às técnicas convencionais de cultivo microbiológico, como maior poder de tipificação e discriminação, maior rapidez, bom limite de detecção, maior seletividade e especificidade, potencial para automação e a possibilidade de trabalhar com bactérias que não são cultiváveis em meios de cultura normalmente utilizados (Busch, Nitschko, 1999). As principais desvantagens para a implantação da PCR na rotina laboratorial são a presença de inibidores da enzima *Taq* polimerase em alguns alimentos, o alto investimento em equipamentos e reagentes e a falta de aprovação, padronização e regulamentação por parte das organizações oficiais (Malorny et al., 2003).

A detecção de *S. aureus* em alimentos pode ser realizada através da técnica de PCR pela amplificação de sequências específicas do DNA deste micro-organismo, como já foi demonstrada para as sequências da região intergênica 16S-23S do rDNA (Straub, Hertel, Hammes, 1999), do gene *nuc* da termonuclease (Brakstad, Aasbakk, Maeland, 1992; Wilson, Cooper, Gilmour, 1991; Yang et al., 2007), do gene *coa* da coagulase (Ahmadi et al., 2010) e do gene *femA*, que codifica para um fator essencial na resistência à meticilina em *S. aureus* (Mehrotra, Wang, Johnson, 2000). Já a identificação do potencial enterotoxigênico de isolados de estafilococos oriundos de alimentos pode ser

realizada a partir da amplificação dos genes codificadores das diversas enterotoxinas pela técnica de PCR, sendo na maioria das vezes combinada à pesquisa de produção de enterotoxinas por métodos imunológicos. A amplificação dos genes de EE pode ser realizada de forma isolada, através do uso de somente um par de *primers*, ou ainda utilizando inúmeros pares na mesma reação, possibilitando a amplificação simultânea de diferentes seqüências. Desta forma, esta técnica recebe a denominação de multiplex PCR, e seu uso já foi demonstrado na detecção dos diversos genes de EE (Hwang et al., 2007; Monday et al., 2001; Sharma, Rees, Dodd, 2000; Shylaja, Murali, Batra, Bawa, 2010; Tamarapu et al., 2001). Outras variações da técnica de amplificação já foram utilizadas na detecção de *S. aureus* e suas enterotoxinas, como o *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD PCR) (Pinto, Chenoll, Aznar, 2005) e a PCR aliada à enzima transcriptase reversa (RT-PCR). Esta técnica se baseia na utilização do cDNA de isolados bacterianos como *template* na reação, que por sua vez corresponde ao RNA inicialmente extraído e convertido em cDNA pela ação da transcriptase reversa, e vêm sendo alvo de diversos estudos com o objetivo de determinar um protocolo que permita traçar uma associação com a produção de enterotoxinas (Alarcon, Vicedo, Aznar, 2006; Klotz, Opper, Heeg, Zimmermann, 2003; Letertre, Perelle, Dilasser, Fach, 2003a).

Apesar de constituírem uma ferramenta importante na determinação do potencial enterotoxigênico dos isolados de estafilococos, as técnicas de detecção molecular de enterotoxinas apresentam a limitação de não serem capazes de efetivamente demonstrar a existência dessas proteínas e a interpretação dos dados obtidos a partir da utilização dessas técnicas deve ser cautelosa. Na maioria das vezes, sugere-se a verificação concomitante da capacidade de produção de enterotoxinas por métodos imunológicos, o que permitiria determinar com mais segurança o potencial dos isolados em causar intoxicações alimentares.

5. Métodos de detecção e quantificação de enterotoxinas estafilocócicas

Segundo o Laboratório de Referência para Estafilococos Coagulase Positivos da União Européia (ANSES, França), o diagnóstico de surtos ou casos de intoxicação alimentar causados por EE somente é considerado confirmado quando da obtenção de ao menos dois dos seguintes dados: i) a recuperação de no mínimo 10^5 UFC/g ou mL nas sobras de alimento; ii) detecção de EE nos restos de alimentos e/ou iii) isolamento da mesma cepa nos pacientes acometidos e no alimento incriminado (Hennekinne et al., 2010). No entanto, na maioria dos surtos dessa natureza, é difícil relacionar o alimento incriminado com os pacientes afetados, e mais ainda, estabelecer a origem da contaminação nos alimentos envolvidos, sobretudo se for considerado que muitos possuem uma vida de prateleira muito curta, comprometendo a análise de outras unidades de um mesmo lote. Estes fatos contribuem para a ocorrência de inúmeros surtos inconclusivos, o que determina um subregistro de casos.

Enquanto a enumeração de *S. aureus* é realizada através de técnicas microbiológicas clássicas, a detecção das EE é baseada em três métodos diferentes: bioensaios, métodos imunológicos ou moleculares. Os bioensaios foram os primeiros ensaios desenvolvidos para confirmar a presença de EE, sendo ainda utilizados na avaliação da capacidade emética de enterotoxinas não-identificadas, como também na determinação do impacto de diversos tratamentos sobre a atividade das enterotoxinas. A administração oral de extratos de alimentos envolvidos em surtos ou do sobrenadante de cultivos bacteriológicos em macacos jovens, de preferência da espécie Rhesus (*Macaca mulatta*), fornece os dados mais confiáveis acerca da capacidade emética dessas proteínas (Surgalla, Bergdoll, Dack, 1953). Por outro lado, o custo de manutenção dos animais, as questões éticas relacionadas ao bem-estar animal, bem como o desenvolvimento de resistência após administrações sucessivas (Sugiyama, Bergdoll, Dack, 1962), limitaram o uso rotineiro deste tipo de ensaio na detecção de EE (Bergdoll et

al., 2006). Além disso, os sintomas característicos de intoxicação estafilocócica somente surgem nestes animais mediante à administração de quantidade de enterotoxinas superiores a 200 ng, sendo considerado um valor muito alto em comparação àqueles normalmente encontrados em alimentos envolvidos em surtos de intoxicação alimentar. Desta forma, o bioensaio em macacos não deve ser considerado o método mais apropriado para caracterizar a ocorrência de surtos de intoxicação alimentar causada por EE (Hennekinne et al., 2010).

Com o advento da purificação da primeira enterotoxina por Bergdoll, Sugiyama, Dack (1959), foi possível desenvolver testes imunológicos, baseados na capacidade de reação entre as enterotoxinas e seus anticorpos específicos. O primeiro método imunológico desenvolvido foi o *Optimum Sensitivity Plate*, que apresenta um limite de detecção de 0,5 µg/mL, e no qual há a formação de uma linha de precipitação quando a concentração enterotoxina-anticorpo é adequada. Contudo, este método não é suficientemente sensível para detectar enterotoxinas em amostras de alimentos, sendo utilizado principalmente na identificação preliminar do potencial enterotoxigênico de cepas de estafilococos. Posteriormente, Casman, Bennett, Dorsey, Stone (1969) desenvolveram a técnica de microimunodifusão em lâminas, que apresenta um nível de sensibilidade de 0,05 µg/mL, sendo ainda utilizada como padrão-ouro pela entidade americana *Food and Drug Administration* na validação de novos métodos de detecção de EE. Contudo, a necessidade de preparação criteriosa das lâminas, a carência de pessoal especializado na execução e interpretação dos resultados, além do extenso tempo de análise contribuíram com o desuso desta técnica na rotina laboratorial (Bergdoll et al., 2006).

Com a demonstração de que algumas cepas produzem enterotoxinas em quantidades muito baixas (Kokan, Bergdoll, 1987), e ainda capazes de provocar surtos de intoxicação alimentar (Evenson, Hinds, Bernstein, Bergdoll, 1988), a detecção de enterotoxinas pelos métodos de imunodifusão em gel demonstrou-se inválida e tornou-se necessário o desenvolvimento de métodos mais sensíveis. O primeiro método capaz de

detectar enterotoxinas em concentrações inferiores a 1 ng/mL foi o radioimunoensaio (RIA) (Johnson, Bukovic, Kauffman, Peeler, 1971; Roborn, Dighton, Yano, Dickie, 1975). Este ensaio é baseado na competição por anticorpos específicos entre padrões de enterotoxinas radioativamente marcados e moléculas de enterotoxinas presentes nas amostras de alimentos. Contudo, esta técnica não é mais utilizada devido aos inconvenientes da utilização do material radioativo, principalmente pela dificuldade no descarte e o elevado risco de vida (Bergdoll et al., 2006). Posteriormente, Fujikawa, Igarashi (1988) desenvolveram um método rápido e eficiente para a detecção de enterotoxinas clássicas (SEA a SEE) em amostras de alimentos e em sobrenadante de culturas. Neste teste, denominado *Reverse Passive Latex Agglutination*, os anticorpos específicos estão ligados à partículas de látex, e na presença de enterotoxinas, se aglutinam, formando aglomerados facilmente visíveis. Este teste é amplamente comercializado, sendo utilizado como ferramenta na avaliação do potencial enterotoxigênico de cepas de *Staphylococcus* spp. isoladas de alimentos (Igarashi, Shingaki, Fujikawa, Ushioda, Terayama, 1985).

Entretanto, o método imunológico mais utilizado na detecção e quantificação de EE é o *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA), cujo limite de detecção é em torno de 0,1 a 0,5 ng/g ou mL. Atualmente, estão disponíveis diversos *kits* comerciais para a detecção de EE que se fundamentam na técnica ELISA. No entanto, o tipo mais frequentemente encontrado é o ELISA duplo-sanduíche, no qual os anticorpos imobilizados contra uma superfície reagem com as enterotoxinas presentes na amostra, e após o tratamento com o conjugado anticorpo-enzima, fornece um resultado que pode ser interpretado de forma qualitativa ou quantitativa, de acordo com a intensidade da coloração formada na reação (Saunders, Bartlett, 1977). Apesar de ser uma ferramenta de detecção rápida e simultânea, os *kits* ELISA atualmente disponíveis permitem somente a detecção das enterotoxinas clássicas (SEA-SEE), ainda que tenham sido obtidos anticorpos para SEG, SEH, SEI e SEIQ, o que limita a obtenção de dados acerca da

prevalência destas toxinas nos casos de intoxicação alimentar (Hennekinne et al., 2012; Omoe et al., 2002). Além disso, alguns *kits* apresentam algumas inconveniências, tais como a baixa especificidade devido à interação com outras proteínas, como a proteína A, bem como a ocorrência de reações falso-positivas quando utilizados na análise de determinados alimentos (Wieneke, 1991).

Devido às dificuldades encontradas nas metodologias do tipo ELISA, outras estratégias de detecção e quantificação de EE vêm sendo desenvolvidas. Recentemente, a espectrometria de massa (MS) pode ser considerada uma técnica bastante promissora na análise de enterotoxinas presentes em alimentos, através principalmente da estratégia de *Protein Standard Absolute Quantification* (PSAQ). Esta metodologia baseia-se na utilização de enterotoxinas marcadas com átomos isótopos como padrões internos nas análises de espectrometria de massa. Quando comparada aos testes do tipo ELISA, a PSAQ mostrou-se mais específica e sensível, apesar de exigir mais tempo no preparo das amostras e apresentar um custo mais elevado (Dupuis, Hennekinne, Garin, Brun, 2008). Além disso, a MS demonstrou-se também eficiente na determinação de EE quando aliadas a outras técnicas de separação e concentração de proteínas (Hennekinne et al., 2009; Schlosser et al., 2007). Estudos proteômicos têm sido o principal alvo de pesquisas, que visam o desenvolvimento de novas metodologias a serem futuramente utilizadas como substitutas às atualmente utilizadas para detecção e quantificação de EE em alimentos.

6. Métodos de tipificação e determinação da variabilidade genética de *Staphylococcus aureus*.

Diversos métodos de tipificação de *S. aureus* foram desenvolvidos nas últimas décadas, baseados principalmente em características fenotípicas, e mais recentemente em características genotípicas. Os objetivos iniciais desta tipificação incluíam determinar o

grau de adaptação das cepas ao hospedeiro de origem e, principalmente, realizar o monitoramento epidemiológico de cepas multirresistentes à antimicrobianos, como *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) envolvidas em infecções hospitalares. Em alimentos, o uso de técnicas de tipificação com alto poder discriminatório é capaz de fornecer dados mais coerentes sobre a identidade clonal, disseminação e persistência das cepas bacterianas em determinada linha de produção, bem como determinar o foco de contaminação, permitindo assim delinear estratégias mais apropriadas para a prevenção e controle de *S. aureus*.

Segundo os critérios estabelecidos por Maslow, Slutsky, Arbeit (1993), a avaliação dos sistemas de tipificação devem obedecer a cinco critérios: i) habilidade da técnica em prover resultados únicos; ii) reprodutibilidade; iii) poder discriminatório; iv) facilidade de interpretação dos resultados e v) funcionalidade. A reprodutibilidade se refere à capacidade da técnica em produzir o mesmo resultado em todas as repetições do teste para uma mesma cepa. O poder discriminatório está associado à capacidade do teste em distinguir isolados não-relacionados, subdividindo-os em grupos maiores ou menores, segundo o alcance da técnica. Ainda, a facilidade de interpretação e uso de uma técnica são os principais fatores que influenciam a sua incorporação às análises rotineiras. Com base nessas informações, ainda não é possível considerar a existência de um método de tipificação ideal, que apresente todas as características desejáveis, aliadas ao baixo custo e rapidez na obtenção dos resultados.

Inicialmente, a biotipagem de *S. aureus* era a principal técnica utilizada na caracterização dos isolados, e baseava-se nos resultados de quatro testes bioquímicos (estafiloquinase, produção de β -hemolisina, coagulação do plasma bovino e observação da morfologia da colônia em ágar Cristal Violeta), com o objetivo de determinar o provável hospedeiro de origem (Devriese, 1984). No entanto, quando da utilização deste sistema, muitas cepas permaneciam sem uma identificação precisa, sendo nomeadas como o biotipo *non-host specific*, isto é, poderiam estar associadas a mais de um hospedeiro.

Posteriormente, com a incorporação de outros dois testes neste sistema, a produção da proteína A (envolvida na inibição da opsonização pelos macrófagos) e a fagotipagem, foi possível caracterizar outros dois biotipos. Ainda assim, devido às inúmeras inconveniências, como a ocorrência de resultados discordantes, a ausência de padronização dos reagentes e a proibição da comercialização de alguns testes, a técnica de biotipagem vem sendo progressivamente substituída pelos métodos moleculares de tipificação.

Até o presente momento, diversas técnicas moleculares foram desenvolvidas com o objetivo de caracterizar isolados do gênero *Staphylococcus*, sendo *S.aureus* a espécie alvo dos estudos. Zadoks et al. (2000) diferenciam os métodos de tipificação molecular de *S. aureus* em sistemas baseados na variabilidade de somente um gene, como a detecção do polimorfismo no gene da coagulase (*coa*), da proteína A (*spa*) e a ribotipificação, além de sistemas que abrangem a variabilidade total do genoma, que é o caso da eletroforese em campo pulsado (do inglês: *pulsed-field gel electrophoresis*, PFGE). No entanto, atualmente existem técnicas que permitem avaliar a variabilidade genética em inúmeros genes de forma simultânea, como por exemplo, através da tipificação por sequenciamento de *loci* múltiplos (do inglês: *Multilocus Sequence Typing*, MLST).

Dentre as técnicas moleculares disponíveis, a PFGE realizada a partir dos fragmentos de DNA clivados com a endonuclease *Sma*I, é considerada o padrão ouro para a tipificação de *S. aureus*, em especial para MRSA (Struelens, Deplano, Godard, Maes, Serruys, 1992), devido ao seu alto poder discriminatório e reprodutibilidade (Prévost, Jaulhac, Piemont, 1992; Saulnier, Bourneix, Prévost, Andremont, 1993). A técnica de PFGE foi utilizada com êxito na tipificação de cepas de *S. aureus* isoladas de surtos alimentares (Kérouanton et al., 2007; López et al., 2008; Ostyn et al., 2010; Weiler et al., 2011), inclusive na investigação de um surto causado por *S. intermedius* produtor de enterotoxina A (Khambaty et al., 1994). Apesar de mundialmente adotada, a PFGE apresenta algumas desvantagens, como o alto custo de implantação, elevado tempo de

análise, dificuldades de padronização de protocolos e critérios para a interpretação dos dados entre diferentes laboratórios e imobilização dos dados em plataformas de análise privadas, dificultando assim a geração de dados passíveis de serem comparados em nível global.

Devido a atual facilidade de acesso à tecnologia de sequenciamento do DNA, inúmeros métodos baseados em sequenciamento genético vem sendo rotineiramente utilizados na tipificação de *S. aureus*. O uso de métodos baseados em sequências é vantajoso, pois permite a obtenção de resultados menos ambíguos que podem ser importados para bancos de dados virtuais, como os já existentes para as técnicas de MLST e tipificação pelo gene *spa* (do inglês: *spa typing*). Desta forma, é possível a comparação de dados locais com dados de outros estudos, anteriormente realizados em localizações geográficas variadas, permitindo assim um melhor entendimento sobre o panorama genético das populações em estudo (Faria, Carrico, Oliveira, Ramirez, de Lencastre, 2008).

Assim, a MLST é uma das técnicas mais utilizadas nos estudos epidemiológicos de MRSA envolvidos em infecções hospitalares, como também nos estudos evolutivos de *S. aureus* de origens variadas. Em *S. aureus*, a MLST está baseada no estudo das sequências internas de sete genes altamente conservados, a saber: carbamato quinase (*arcC*); chiquimato desidrogenase (*aroE*), glicerol quinase (*glpF*), guanilato quinase (*gmk*), fosfatoacetiltransferase (*pta*), triosefosfato isomerase (*tpi*) e acetil coenzima A acetiltransferase (*yqiL*). Adicionalmente, outra técnica é utilizada em paralelo à MLST, com o objetivo de definir os tipos clonais (CC) na designação internacional de isolados de MRSA. Esta técnica é denominada de tipificação do *Staphylococcal Cassette Chromosome mec* (SCCmec), na qual se caracteriza o elemento genético móvel que carrega o gene de resistência para meticilina, *mecA*. No entanto, apesar de bastante difundida, a MLST não apresenta o poder discriminatório ideal para os estudos de disseminação de cepas de *S. aureus* em caráter epidêmico (Melles et al., 2007).

O sequenciamento da região polimórfica X do gene *spa*, que contém um número variável de regiões repetidas de 24 pb flanqueadas por regiões conservadas, é denominado *spa typing*. Este método baseado no sequenciamento de somente um *locus* combina inúmeras vantagens, como a rapidez, a reprodutibilidade e a capacidade de importação/exportação dos dados. Além disso, devido à estrutura repetitiva da região amplificada, é possível obter informações sobre as variações ocorridas em nível local, isto é, na investigação epidemiológica de surtos alimentares, bem como em escala mundial no caso de análises filogenéticas (Koreen et al., 2004). Apesar dessas evidências, outros autores sugerem a utilização da *spa typing* em paralelo com outras técnicas de tipificação molecular (Frenay, Bunschoten, Schouls, Van Leeuwen, Vanderbroucke-Grals, 1996; Hallin et al., 2007; Ruzickova et al., 2008; Shopsin et al., 1999).

Lange, Cardoso, Senczek, Schwarz (1999) avaliaram o poder discriminatório de vários métodos de tipificação através de um coeficiente de diferenciação e verificaram maior poder discriminatório para a análise de PFGE, seguido pela análise da região intergênica do rDNA 16s e 23s e, por fim, pelas técnicas de *spa* e *coa typing*. As técnicas que apresentaram menor capacidade de discriminação foram a caracterização bioquímica, análise do perfil plasmidial e teste de resistência a antimicrobianos.

A concordância entre os resultados obtidos nas variadas técnicas de tipificação disponíveis (*spa typing*, MLST, PFGE) sugerem a ocorrência de baixos níveis de recombinação em *S. aureus*, em uma estrutura populacional predominante clonal e a presença de marcadores filogenéticos nesta espécie. Acredita-se que *S. aureus* não sofre recombinações extensivas e a ocorrência de variabilidade genética é oriunda de mutações pontuais que não apresentam relações com os diferentes *loci* (Feil et al., 2003).

Portanto, nenhuma técnica de tipificação molecular é superior à outra. A escolha do método mais adequado deve ser baseada no objetivo da análise e nas características da população que se deseja avaliar. Sugere-se que para investigações epidemiológicas de surtos, é preferível a utilização da técnica de PFGE, por apresentar maior

reprodutibilidade e capacidade de discriminação dos isolados que tenham sofrido com o acúmulo de mutações. Para estudos epidemiológicos globais de populações, como a distribuição e frequência de cepas, potencial patogênico de certas linhagens clonais, é recomendado o uso de técnicas que sejam capazes de avaliar as variações genéticas que se acumulam de forma gradual (Enright, 2002; Koreen et al., 2004).

7. Perspectivas e desafios

Atualmente, a estratégia mais eficiente na investigação de intoxicações alimentares causadas por EE é a realização de uma abordagem global da situação, através do uso combinado das diversas técnicas de diagnóstico disponíveis. Desta forma, o uso integrado de métodos clássicos de cultivo microbiano, aliados à técnicas imunológicas e às tecnologias para manipulação de DNA, complementadas também pelos estudos proteômicos, permite um estudo bem mais detalhado acerca da ocorrência de casos e surtos de intoxicações estafilocócicas (Figura 3).

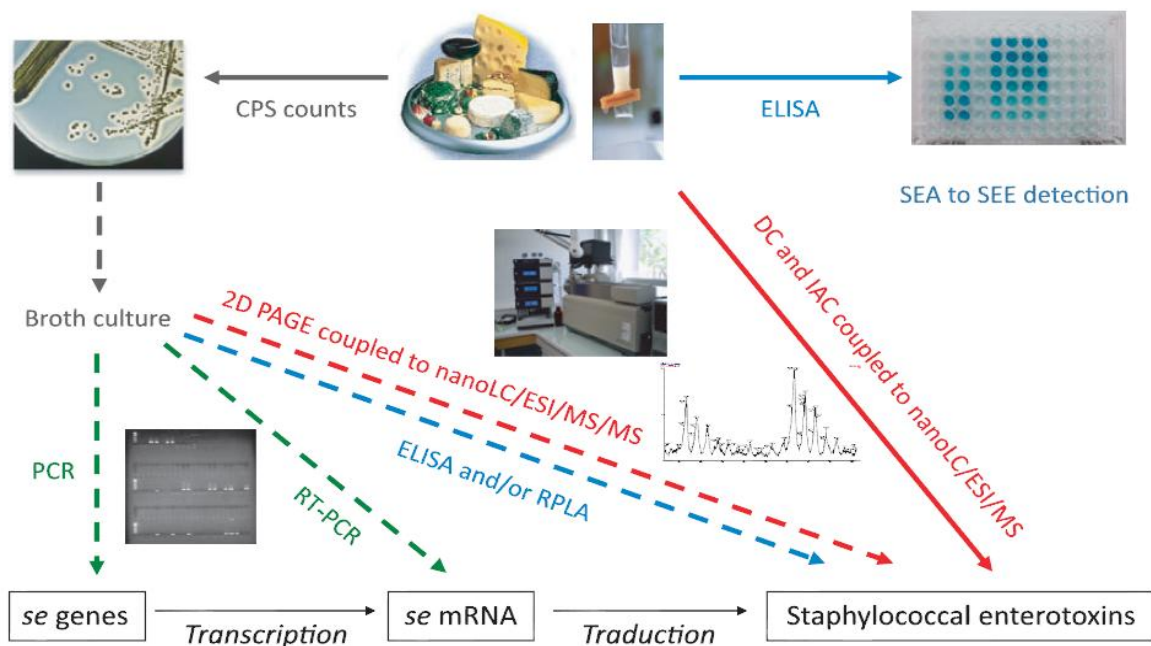


Figura 3. Visão geral das técnicas atualmente disponíveis para a caracterização de surtos causados por enterotoxinas estafilocócicas, bem como para a determinação do potencial enterotoxigênico de cepas de *Staphylococcus* spp. isoladas de alimentos (Hennekinne et al., 2012).

Aliado à isso, os estudos em microbiologia preditiva tem ganhado forte incentivo por parte da indústria de alimentos nos últimos anos. Além de ser considerada uma ferramenta muito poderosa na avaliação e gerenciamento de risco, os modelos preditivos podem auxiliar o delineamento de novas tecnologias de processamento como forma de minimizar a ocorrência de intoxicações alimentares (Schelin et al., 2011). No entanto, ainda hoje em diversos países, a caracterização do risco para intoxicação alimentar estafilocócica é baseada somente na identificação e quantificação de ECP nos produtos finais, o que não necessariamente está condicionado à presença de enterotoxinas. Quando avaliado de forma crítica, este parâmetro (ECP) pode ser considerado até mesmo incoerente, pelo fato de não abranger o verdadeiro alvo das investigações, que é propriamente constituído pelas EE.

Atualmente, diversos modelos preditivos de multiplicação e sobrevivência de *S. aureus* estão disponíveis em bancos de dados na internet (PMP: www.pmpnotes.com; ComBase: www.combase.cc), os quais consideram também os possíveis efeitos das características físico-químicas do alimento e do ambiente sobre as taxas de multiplicação deste micro-organismo (Belay et al., 2002). Por outro lado, a escassez de dados similares que compreendam a cinética de produção de enterotoxinas em diferentes matrizes alimentares dificulta o desenvolvimento de novas estratégias para o gerenciamento de risco.

Apesar de ser considerada uma ferramenta promissora, a determinação de modelos preditivos para o estudo da intoxicação alimentar estafilocócica é considerada uma tarefa muito desafiadora, pois inúmeros fatores são capazes de afetar a multiplicação de estafilococos e a produção de enterotoxinas em alimentos. Esses fatores evidenciam a necessidade de preencher as lacunas existentes no entendimento das relações entre multiplicação, sobrevivência e produção de enterotoxina em sistemas variados. Adicionalmente, esforços devem ser dirigidos aos estudos que tenham por objetivo o desenvolvimento de novas metodologias de detecção, bem como a determinação da prevalência, do efeito dose-dependente e a elucidação dos mecanismos de regulação das EE em alimentos.

OBJETIVOS

Objetivo geral

- Caracterizar por métodos fenotípicos e genotípicos o potencial enterotoxigênico de isolados identificados como *Staphylococcus* spp. obtidos de amostras de leite cru e queijo fresco obtidas na região de Viçosa/MG.

Objetivos específicos

- Identificar fenotipicamente os isolados de *Staphylococcus* spp. provenientes de amostras de leite cru e queijo fresco;
- Determinar a variabilidade genética da população de *Staphylococcus* spp. por PFGE;
- Avaliar a capacidade de produção de enterotoxinas estafilocócicas por esses isolados pelo método de ensaio imunoenzimático indireto;
- Investigar a presença de genes de enterotoxinas estafilocócicas nos isolados por PCR;
- Determinar a ocorrência dos grupos *egc* nos isolados por RFLP-PCR;
- Determinar a distribuição dos grupos *agr* nos isolados através de PCR e sequenciamento genético.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Coleção de micro-organismos

Em um projeto de pesquisa realizado entre 2007 e 2008, aproximadamente 600 isolados identificados como *Staphylococcus* spp. foram obtidos de amostras de leite cru e queijo frescal da região de Viçosa, MG. As amostras de leite cru e queijo frescal foram submetidas a análises microbiológicas para enumeração de *Staphylococcus* spp. em três meios de cultura distintos: Ágar Baird-Parker enriquecido com gema de ovo e telurito de potássio; Ágar Fibrinogênio Plasma de Coelho e Sistema 3M™ Petrifilm™ *Staph Express Count* (Viçosa et al., 2010). A partir das colônias obtidas, uma amostragem foi selecionada, avaliada inicialmente quanto à capacidade de produzir coagulase e termonuclease, armazenadas em caldo Infusão Cérebro Coração (BHI) com glicerol a 20% e congeladas em ultrafreezer a -20 °C, até a realização das etapas posteriores. Considerando a coleção de culturas inicialmente formada, 89 isolados foram selecionados e incluídos no presente estudo. Para realização dos testes fenotípicos e genotípicos, todos os isolados foram purificados em ágar tripticase de soja (TSA, Oxoid Limited, Basingstoke, UK), com incubação a 35 °C, por 24 h, e colônias isoladas transferidas para tubos de ensaio contendo caldo tripticase de soja (TSB, Oxoid), com incubação a 35 °C, por 24 h. As culturas obtidas foram submetidas aos testes fenotípicos e genotípicos descritos a seguir.

2. Caracterização fenotípica dos isolados

Considerando a excelente correlação entre os testes da coagulase e termonuclease para a identificação de estafilococos isolados de amostras de leite cru e queijo frescal (Viçosa et al., 2010), este estudo adotou a capacidade de produzir coagulase como parâmetro para o delineamento dos testes realizados e também para a discussão dos resultados obtidos. Assim, os isolados inicialmente caracterizados como coagulase

positivos foram submetidos à caracterização bioquímica complementar para identificação a nível de espécie. Os testes bioquímicos utilizados compreenderam: i) coloração diferencial de Gram; ii) verificação da atividade hemolítica em Ágar Sangue de Carneiro 5%; iii) produção de catalase; iv) capacidade de fermentação aeróbica do manitol; v) capacidade de fermentação aeróbica e anaeróbica da maltose; vi) multiplicação em BPA adicionado de acriflavina. Além disso, alguns isolados caracterizados preliminarmente como coagulase-negativos foram aleatoriamente selecionados e incorporados ao estudo, com o objetivo de estabelecer comparações entre as duas populações, apesar de não terem sido submetidos à testes bioquímicos adicionais.

Os testes de coloração de Gram, produção de catalase e verificação da atividade hemolítica foram realizados de acordo com os procedimentos propostos por Koneman (2005). Para a verificação da produção de coagulase, 0,5 mL das culturas microbianas obtidas foi adicionado em 0,5 mL de plasma de cavalo, com incubação a 37 °C, e leituras a cada 30 min, por um período de 6 h, com leitura final 24 h após a inoculação (Silva et al., 2005). A avaliação dos coágulos formados foi realizada de acordo com Lancette, Bennett (2001), considerando-se como positivas as culturas com intensidade entre 3+ e 4+. Ainda, para a realização do teste da termonuclease, os tubos contendo previamente o cultivo bacteriano eram submetidos a 100 °C por 15 min, para ativação da enzima. Em seguida, 10 µL do inóculo inativado eram semeados em pequenos orifícios previamente preparados em ágar DNase com azul de toluidina, com incubação a 37 °C por 4 h. A formação de um halo de coloração rósea ao redor do orifício era considerada positivo para o teste da termonuclease (AOAC, 1995).

Com o objetivo de verificar a capacidade de fermentar maltose e manitol, uma solução de cada açúcar foi preparada na concentração de 10% e esterilizada em filtros com poros de 0,22 µm (Merck Millipore, Billerica, EUA). Estas soluções foram adicionadas à Ágar Púrpura de Bromocresol, com obtenção de meios de cultura com concentração final a 1 % de cada açúcar. O teste de fermentação do manitol foi realizado em placas de

Petri, enquanto que a fermentação aeróbica e anaeróbica da maltose foi realizada em tubos de ensaio e em duplicata, na qual era adicionada uma camada de óleo mineral sobre o meio de cultura em somente um dos tubos, para que fosse estabelecido um ambiente anaeróbio. Os testes de fermentação de açúcares foram realizados a 37 °C, com leituras sucessivas a cada 24 h, até completar 72 h de incubação.

3. Verificação da produção de enterotoxinas estafilocócicas

Para a detecção de enterotoxinas estafilocócicas (SEA, SEB, SEC₁, SEC₂, SEC₃, SED, SEE), os isolados bacterianos foram semeados em TSA (Oxoid) e após 24 h de incubação a 37 °C, uma colônia isolada era transferida para o caldo 3M™ *Dehydrated Media Staph Growth Media* (3M Food Safety, St. Paul, USA), com posterior incubação a 37 °C por 16 h. Os ensaios de detecção de enterotoxinas estafilocócicas foram conduzidos utilizando o *kit* 3M™ TECRA™ Staph aureus VIA (3M Food Safety Inc., St. Paul, MI, EUA), com leitura visual dos resultados conforme indicado pelo fabricante.

4. Caracterização molecular dos isolados bacterianos

4.1. Determinação da variabilidade genética dos isolados por eletroforese em campo pulsado (PFGE)

As análises de macrorrestrição do DNA dos isolados bacterianos foram realizadas considerando o protocolo proposto por André et al. (2008), com algumas modificações. Resumidamente, a partir de um inóculo em caldo TSB com densidade óptica de aproximadamente 1 ($\lambda = 590$ nm) obtido após incubação a 37 °C por 16 h, 150 μ L eram transferidos para microtubos de 1,5 mL e submetidos à centrifugação à 16000 X g por 5 min, com descarte do sobrenadante. Em seguida, o *pellet* era ressuspendido em 150 μ L da solução *Cell Suspension Buffer* (10 mM Tris–HCl, pH 7.2, 20 mM NaCl, 50 mM EDTA), acompanhado de 7 μ L de solução de lisostafina (1 mg/mL, Sigma-Aldrich Co., St. Louis,

MO, EUA) e 7 µL de solução de lisozima (10 mg/mL, Sigma-Aldrich Co.), juntamente com 150 µL de agarose de baixo ponto de fusão (LMP) preparada a 2% e mantida a 50 °C. Logo após, a mistura era distribuída nas formas de confecção de *plugs* e deixada em temperatura ambiente para solidificação. Os *plugs* eram então transferidos para microtubos de 1.5 mL contendo 1 mL da solução *Lysis Buffer* (10 mM Tris-HCl pH 7.2, 50 mM NaCl, 50 mM EDTA, 0.2% desoxicolato, 0.5% sarcosil) e incubados a 37 °C por 1 h. Em seguida, a solução prévia era substituída por 500 µL de solução de Proteinase K (2 mg/mL - 250 mM EDTA pH 9.0, 1% sarcosil), com incubação a 50 °C por 30 min. Após a proteólise, os *plugs* eram rinsados com 1,4 mL de solução *Wash Buffer* (10 mM Tris-HCl pH 7.6, 0.1 mM EDTA), e em seguida, eram realizadas três lavagens sucessivas com a mesma solução com pausa de 30 min em cada lavagem.

Para a digestão enzimática, cerca de 1/5 do *plug* original era seccionado e posicionado em microtubos de 0,5 mL devidamente identificados. Os *plugs* eram submetidos à estabilização inicial em 200 µL do tampão da enzima 1X (TE) com repouso de 10 min. Após a retirada do tampão prévio, 150 µL do TE 1X eram novamente adicionados, acompanhados de 20 U da enzima de restrição *SmaI* (Promega Corporation, Madison, EUA), seguido de incubação a 25 °C por 4 h. Alternativamente, a digestão também foi realizada utilizando-se 10 U da enzima, com incubação *overnight* a 25 °C.

O DNA digerido foi separado em equipamento CHEF-DRIII (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA), utilizando o protocolo de 40-100s por 2 h, seguido de 2-35 s por 20 h, em ângulo de 120°, 6V/cm, em tampão TBE 0,5X mantido a 14 °C, acompanhado de marcador de peso molecular *Pulse Marker*TM 50-1,000 Kb (Sigma-Aldrich Co.) em pelo menos duas canaletas por gel realizado.

Os géis obtidos foram revelados em banho de imersão com o corante intercalante GelRedTM 3X (Biotium Inc., Hayward, CA, EUA) e visualizados em transiluminador sob luz ultravioleta. As bandas obtidas foram analisadas usando o *software* BioNumerics v.6.6.4 (Applied Maths, Kortrijk, Bélgica). Os dendrogramas foram obtidos através do método de

agrupamento *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean* (UPGMA), usando o coeficiente de similaridade de Dice, com tolerância de 5%.

4.2. Extração de DNA

A extração do DNA genômico foi realizada a partir do cultivo *overnight* dos isolados bacterianos a 37 °C, utilizando o kit *Wizard Genomic DNA Purification* (Promega Corporation, Madison, USA), de acordo com as normas do fabricante. Para avaliar a qualidade do DNA obtido, uma alíquota de 2 µL de cada amostra foi incorporada à 1 µL do corante intercalante GelRed™ 20X (Biotium Inc.) e 2 µL do corante Blue/Orange Loading Dye 6X (Promega Corp.), e em seguida submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão Tris Borato EDTA (TBE) 0,5X, sendo posteriormente visualizados sob luz UV em transiluminador. Após este procedimento, as amostras foram estocadas a -20 °C para futuras análises.

Em todos os testes de caracterização molecular, as seguintes cepas-referência de *S. aureus* foram utilizadas como controle positivos: FRI 100 (*sea*); ATCC 14458 (*seb*, *sek*, *seq*); ATCC 19095 (*sec*, *seg*, *seh*, *sei*, *sel*, *sem*, *sen*, *seo*, *seu*, *locus egc*); FRI 472 (*sed*, *locus egc*); FRI 326 (*see*).

4.3. Detecção de genes de enterotoxinas estafilocócicas por PCR convencional

A detecção de 16 genes de enterotoxinas (*sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, *sei*, *selj*, *selk*, *sell*, *selq*, *selm*, *seln*, *selo*, *selu*), foi realizada através da técnica de PCR, utilizando oligonucleotídeos cujas sequências já se encontravam previamente descritas na literatura (Tabela 4). O gene *femA* foi pesquisado com o objetivo de determinar a frequência de *S. aureus* entre os isolados, segundo o protocolo proposto por Mehrotra et al. (2000). Sendo assim, os genes *femA*, *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *sen*, *seq* e *seu* foram detectados em reações isoladas, enquanto que *seg+sei*, *seh+sej*, *sek+sel* e *sem+seo* foram detectados utilizando a mistura dos pares de *primers* correspondentes.

As reações de amplificação para os genes de enterotoxinas clássicas (*sea-see*) e *femA* foram conduzidas em 25 µL de mistura contendo: 12,5 µL do *kit* GoTaq® Green Master Mix 2X (Promega Corp.), 8,5 µL de água nuclease *free*, 400 nM de cada *primer* e 2 µL do *template*. As reações foram conduzidas nas seguintes condições de amplificação: desnaturação inicial a 95 °C por 5 min, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 95 °C por 45 s, anelamento a 46,2 °C por 45 s e extensão a 72 °C por 45 s, finalizando com uma extensão a 72 °C por 10 min.

De forma similar, cada reação *uniplex* para *sen*, *seq* e *seu* continham 12,5 µL do *kit* GoTaq® Green Master Mix 2X (Promega Corp.), 8,5 µL de água nuclease *free*, 400 nM de cada *primer* e 2 µL do *template*. Já as reações *multiplex* para a amplificação dos genes *seg+sei*, *seh+sej*, *sek+sel* e *sem+seo* eram constituídas de 12,5 µL do *kit* GoTaq® Green Master Mix 2X (Promega Corp.), 8,5 µL de água nuclease *free*, 200 nM de cada *primer* e 2 µL do *template*, totalizando 25 µL de volume final.

As condições de amplificação para os genes *sem+seo* e *sen* compreendiam: desnaturação inicial a 94 °C por 5 min; 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 5 min, anelamento a 55 °C por 1 min e extensão a 72 °C por 1 min; com extensão final a 72 °C por 5 min (Jarraud et al., 2002). Para a detecção de *seg+sei*, *seh+sej*, *sek+sel* e *seq* foram consideradas as seguintes condições de amplificação: desnaturação inicial a 95 °C por 5 min; 35 ciclos de desnaturação a 95 °C por 30 s, anelamento a 52 °C por 30 s e extensão a 72 °C por 1,5 min; com extensão final a 72 °C por 5 min (Bania et al., 2006). Por fim, para a detecção de *seu*, foi utilizado o seguinte protocolo de amplificação: 94 °C por 5 min; 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 2 min, anelamento a 64 °C por 1 min e extensão a 72 °C por 72 s; com extensão final a 72 °C por 5 min (Nashev et al., 2007).

Todos os produtos foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose a 2,5%, em tampão TBE 0,5X, sendo posteriormente revelados em solução de GelRed™ 3X (Biotium Inc.) e visualizados em transiluminador sob luz ultravioleta.

Tabela 4. Oligonucleotídeos utilizados na amplificação de genes de enterotoxinas estafilocócicas pela reação da polimerase em cadeia.

Gene-alvo	Sequência nucleotídica (5' - 3')	Tamanho do produto (pb)	Temperatura de anelamento	Referências
<i>femA</i>	AAAAAAGCACATAACAAGCG GATAAAGAAGAAACCAGCAG	132		
<i>sea</i>	ACGATCAATTTTTACAGC TGCATGTTTTACAGAGTTAATC	544		
<i>seb</i>	GAATGATATTAATTCGCATC TCTTTGTCGTAAGATAAACTTC	416	46,2 °C	Mehrotra et al. (2000); Rosec, Gigaud (2002)
<i>sec</i>	GACATAAAAGCTAGGAATTT AAATCGGATTAACATTATCCA	257		
<i>sed</i>	CTAGTTTGGTAATATCTCCT TAATGCTATATCTTATAGGG	317		
<i>see</i>	TAGATAAAGTTAAAACAAGC TAACCTACCGTGGACCCTTC	170		
<i>seg</i>	GTTAGAGGAGTTTTATG TTCCTCAACAGGTGGAGA	198		
<i>seh</i>	CAACTGCTGATTTAGCTCAG CCCAAACATTAGCACCA	173		
<i>sei</i>	GGCCACTTTATCAGGACA AACTTACAGGCAGTCCA	328		
<i>selj</i>	GTTCTGGTGGTAAACCA GCGGAACAACAGTTCTGA	131	52,0 °C	Bania et al. (2006)
<i>selk</i>	GGAGAAAAGGCAATGAA TAGTGCCGTTATGTCCA	516		
<i>sell</i>	CGATGTAGGTCCAGGA TTCTTGTGCGGTAACCA	369		
<i>selq</i>	GGAATTACGTTGGCGAA AACTCTGCTTGACCA	330		
<i>selm</i>	CTATTAATCTTTGGGTTAATGGAGAAC TTCAGTTTCGACAGTTTTGTTGTCAT	300		
<i>seln</i>	ATGAGATTGTTCTACATAGCTGCAAT AACTCTGCTCCCACTGAAC	680	55,0 °C	Jarraud et al. (2002)
<i>selo</i>	AGTTTGTGTAAGAAGTCAAGTGTAGA ATCTTTAAATTCAGCAGATATCCATCTAAC	180		
<i>selu</i>	CCTTTAAGGGTAATGTGTACG ATCATGCTCGGTACACC	496	64,0 °C	Nashev et al. (2007)

4.4. Detecção e diferenciação do locus *egc* por RFLP-PCR

Para verificar a natureza do *locus egc* presente nos isolados bacterianos, utilizou-se uma variação da técnica de PCR, o *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP-PCR), segundo o protocolo proposto por Collery, Smyth (2007) e Collery et al. (2009), com algumas modificações. Os oligonucleotídeos utilizados na detecção do *locus egc* estão listados na Tabela 5.

Tabela 5. Sequência nucleotídica dos oligonucleotídeos desenhados por Letertre et al. (2003b) para a detecção da natureza do *locus egc*.

Denominação	Sequência nucleotídica (5'- 3')
PSE1	TGATAATTAGTTTTAACACTAAAATGCG
PSE2	TAAATAAATGGCTCTAAAATTGATGG
PSE4	CGTCTAATTGCCACGTTATATCAGT
PSE6	ATCCGCTGAAAAATAGCATTGAT

O par de *primers* PSE1/PSE4 foi designado para amplificar a região do *egc* que codifica tanto para os pseudogenes $\Psi ent1$ e $\Psi ent2$, como também para os genes *selu* ou *selu_v*, iniciando no códon de parada do gene *sei*, até alcançar os primeiros 172 nucleotídeos da porção 5' do gene *seln*. Desta forma, o tamanho do produto obtido nas reações utilizando estes oligonucleotídeos corresponde a 1135 pares de bases (pb) nas cepas *selu*⁻, e a 1149 pb nas cepas *selu*⁺. Já a sequência 5'-CTCTAAAATTGATGG-3' constituinte do *primer* PSE2, corresponde exatamente à inserção de 15 nucleotídeos presente nos genes *selu* ou *selu_v*, sendo especificamente utilizado na amplificação destas regiões. Sendo assim, as reações de amplificação utilizando os pares de *primers* PSE2/PSE4 e PSE2/PSE6 resultam em fragmentos de PCR que apresentam 790 e 142 pb, respectivamente, nos isolados *selu*⁺ ou *selu_v*⁺ (Collery et al., 2007; Letertre et al., 2003b).

As reações de amplificação para os conjuntos de *primers* PSE1/PSE4, PSE2/PSE4 e PSE2/PSE6 continham 12,5 µL do *kit* GoTaq® Green Master Mix 2X (Promega Corp.), 8,5 µL de água nuclease *free*, 400 nM de cada primer e 2 µL do *template*, com volume final de 25 µL. As condições de amplificação foram: desnaturação inicial a 94 °C por 4 min; 7 ciclos iniciais de desnaturação a 94 °C por 30 s, anelamento a 56 °C por 30 s, extensão a 72 °C por 4 min; 21 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 s, 56 °C por 35 s, extensão a 72 °C por 4 min; e extensão final a 72 °C por 7 min (Collery et al., 2007). Em seguida, 5 µL dos produtos obtidos eram submetidos à eletroforese horizontal em tampão TBE 0,5X, revelados em banho de imersão por 1 h em solução de GelRed™ 3X (Biotium Inc.) e visualizados em transiluminador sob luz ultravioleta.

Para dar prosseguimento às análises de RFLP-PCR, os produtos obtidos com o conjunto de oligonucleotídeos PSE1/PSE4 foram submetidos à clivagem enzimática pelas enzimas *BclI* (New England Biolabs Inc., Ipswich, USA), *HphI* (New England Biolabs Inc.) e *HindIII* (Promega Corp.) para a diferenciação dos isolados entre os grupos *egc1* e *egc2* ou *egc3* (Collery et al., 2007). Adicionalmente, com o objetivo de fazer a distinção entre os grupos *egc2* e *egc3*, os mesmos produtos foram submetidos à restrição enzimática com as endonucleases *BbvI* e *TseI* (Collery et al., 2009).

O produto amplificado pelos *primers* PSE1/PSE4 em isolados pertencentes ao grupo *egc1* ($\Psi ent1/\Psi ent2^+$), quando submetido à clivagem pela endonuclease *BclI*, resulta na formação de dois fragmentos, de 496 e 586 pb, enquanto que o mesmo produto de cepas *selu⁺* ou *selu_v⁺* é clivado em três fragmentos distintos de 586, 376 e 135 pb. Além disso, os produtos de PCR de isolados $\Psi ent1/\Psi ent2^+$ são refratários à clivagem pela endonuclease *HphI*, enquanto que a endonuclease *HindIII* é utilizada para confirmar a natureza do grupo *egc1*, gerando dois fragmentos de 958 e 176 pb. Analogamente, os produtos de PCR oriundos de isolados *selu⁺* ou *selu_v⁺* são refratários à *HindIII*, apesar de serem suscetíveis à *HphI*, resultando em dois fragmentos de 850 e 298 pb. Desta forma, utilizando o protocolo descrito acima, é possível realizar uma diferenciação inicial dos

isolados que apresentem o *egc1*, isto é, possuem a sequência correspondente aos pseudogenes $\Psi ent1/\Psi ent2$, daqueles que possuem os genes *selu* ou *selu_v* (Figura 4).

Subsequentemente, com o objetivo de diferenciar os isolados do grupo *egc2* (*selu*⁺) e *egc3* (*selu_v*⁺), foi utilizado o mesmo protocolo de RFLP-PCR descrito acima, substituindo as endonucleases já citadas por *BbvI* e *TseI* (Collery et al., 2009). Essas endonucleases são capazes de realizar clivagens diferenciais nas sequências dos grupos *egc2* e *egc3* amplificadas pelos *primers* PSE1/PSE4, apesar de não conseguirem distinguir as sequências do grupo *egc1* daquelas do grupo *egc3*. As sequências do grupo *egc2* são clivadas em dois fragmentos por ambas as endonucleases, correspondendo à 942 e 206 pb quando clivados por *BbvI*, de 954 e 194 pb quando clivados por *TseI*. Já as sequências do grupo *egc3* geram dois fragmentos de 777 e 165 pb pela endonuclease *BbvI*, além de dois fragmentos de 802 e 152 pb quando clivados por *TseI*, permitindo assim a distinção entre esses dois grupos (Figura 4).

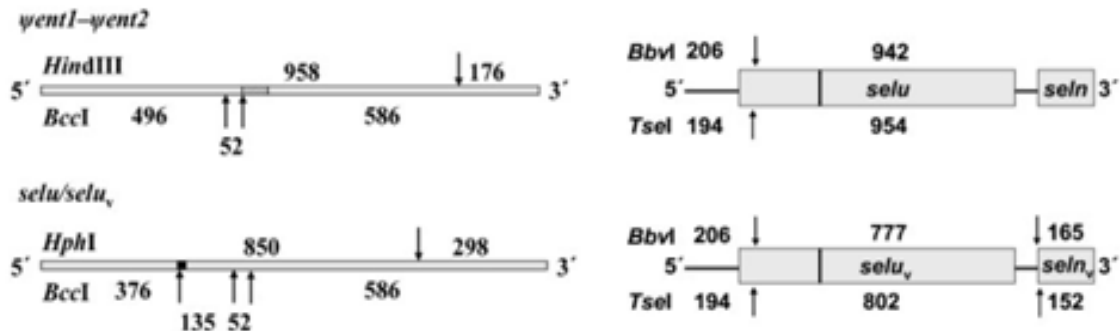


Figura 4. Sítios de clivagem das diferentes enzimas de restrição utilizadas no protocolo de RFLP-PCR para determinação da natureza do locus *egc* (Collery et al., 2007; Collery et al., 2009).

Assim, nas reações de restrição enzimática utilizou-se o produto amplificado pelos *primers* PSE1/PSE4 nas condições anteriormente descritas. A restrição por *HindIII* foi realizada a partir de 6 μ L do produto amplificado, adicionados de 17 μ L de água ultra-pura, 3 μ L do tampão 10X *Buffer E* (60 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 M NaCl, 60 mM MgCl₂, 10 mM DTT), 3 μ L de albumina sérica de bovino (BSA) e 1 μ L da enzima (10 U/ μ L), com

posterior incubação *overnight* a 37 °C. De forma semelhante, as reações de restrição pela endonuclease *HphI* ocorreram *overnight* à 37 °C, e continham 17 µL de água ultra-pura, 6 µL do produto de PCR, 3 µL do tampão 10X *NE Buffer 4* (50 mM acetato de potásio, 20 mM Tris-acetato, 10 mM de acetato de magnésio, 1 mM DTT pH 7,9) e 1 µL da enzima (5 U/µL). Já a restrição por *BclI* foi realizada a partir de 20 µL de produto amplificado, adicionados de 5 µL do tampão 5X *NEB Buffer 1* (10 mM Bistris propano-HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT pH 7,0) e 1 µL da enzima (10 U/µL), com incubação *overnight* a 37 °C. Todos os produtos foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose a 2,5%, em tampão TBE 0,5X, sendo posteriormente revelados em solução de GelRed™ 3X (Biotium Inc.) e visualizados em transiluminador sob luz ultravioleta.

Adicionalmente, para diferenciar as cepas inicialmente identificadas como pertencentes aos grupos *egc2* ou *egc3*, utilizou-se novamente a RFLP-PCR, porém com as endonucleases *BbvI* e *TseI*. Para a clivagem por *BbvI*, utilizou-se 10 µL do produto amplificado pelos *primers* PSE1/PSE4, adicionados de 2,5 µL do tampão 5X *NEB Buffer 2* (50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7.9, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT) e 2 µL da enzima *BbvI* (2 U/µL), com incubação a 37 °C por 4 h. De forma similar, nas reações de clivagem enzimática por *TseI*, utilizou-se o tampão 5X *NEB Buffer 3* (100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7.9, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT) e 1 µL da enzima *TseI* (5 U/µL), com incubação a 65 °C por 4 h. Ao fim das digestões, os produtos resultantes foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose a 2,5%, em tampão TBE 0,5X, sendo posteriormente revelados em solução de GelRed™ 3X (Biotium Inc.) e visualizados em transiluminador sob luz ultravioleta.

4.5. Detecção do locus agr por PCR

Todos os isolados foram submetidos à PCR convencional para amplificação do gene *agr*, utilizando os *primers* listados na Tabela 6, na qual cada reação continha 25 µL do *kit* GoTaq® Green Master Mix 2X (Promega Corp.), 21 µL de água nuclease *free*, 200 nM de cada *primer* e 2 µL do *template*, totalizando um volume de 50 µL por reação. Para a amplificação da porção variável do *agr*, foram utilizadas as seguintes condições de reação: desnaturação inicial a 94 °C por 4 min; 40 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 min, anelamento a 50 °C por 1 min e extensão a 74 °C por 2 min; e ao final uma extensão a 74 °C por 3 min. Todos os produtos obtidos foram avaliados em eletroforese horizontal em gel de agarose a 1%, em tampão TBE 0,5X, revelados em banho de imersão de GelRed™ 20X (Biotium Inc.) e visualizados em transiluminador sob luz ultravioleta.

Tabela 6. Oligonucleotídeos desenhados por van Leeuwen, van Nieuwenhuizen, Gijzen, Verbrugh, van Belkum (2000) e utilizados na amplificação e sequenciamento da porção variável do *locus agr*, segundo o protocolo de Gilot, Lina, Cochard, Poutrel (2002).

Denominação	Sequência nucleotídica (5'-3')
B1	TATGCTCCTGCAGCAACTAA
C2	CTTGCGCATTTTCGTTGTTGA

4.6. Sequenciamento parcial do locus egc e do locus agr

Considerando os resultados obtidos na detecção dos genes *agr* e *egc*, os produtos obtidos foram submetidos a sequenciamento para identificação de possíveis variações nas sequências detectadas. Para o sequenciamento dos produtos das reações para detecção do gene *agr*, fragmentos obtidos de 55 isolados foram selecionados considerando os perfis genéticos obtidos por PFGE. Para o gene *egc*, os produtos obtidos a partir dos *primers* PSE1/PSE4 foram submetidos ao sequenciamento.

Assim, todos os produtos de PCR selecionados foram enviados à empresa MacroGen Inc. (Seoul, Korea), onde foram purificados e submetidos ao sequenciamento

automático utilizando a metodologia adaptada de Sanger, Nicklen, Coulson (1977). As sequências obtidas foram analisadas no *software* de análise de sequências nucleotídicas Sequencher® v.4.1.4 (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, USA) e comparadas com o banco de dados depositado no GenBank *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os isolados selecionados para o presente estudo foram identificados com *S. aureus*, através da presença do gene *femA*. No entanto, dos 89 isolados testados, 71 (79,8%) apresentaram resultado positivo para o teste da coagulase, enquanto 73 (82,0%) foram identificados como termonuclease-positivos. Dos 71 isolados coagulase-positivos, 3 não apresentaram produção concomitante de termonuclease. Por outro lado, dos 18 isolados coagulase-negativos, 5 foram positivos para termonuclease. Em estudo similar, Veras et al. (2008) avaliaram a presença de *femA* em estafilococos provenientes de derivados lácteos, utilizando os mesmos *primers* deste estudo, e observaram que 3 dos 15 isolados coagulase-negativos apresentaram resultados positivos para esse gene. O produto do gene *femA* está associado com a resistência à meticilina em *S. aureus*, e também está envolvido no metabolismo da síntese da parede celular (Hiramatsu, Asada, Suzuki, Okonogi, Yokota, 1992; Kobayashi et al., 1994). Estudos inicialmente demonstraram que *femA* estava especificamente relacionado à *S. aureus* e apresentava correlação excelente com a capacidade de produzir coagulase (Kobayashi et al., 1994; Vannuffel et al., 1995). Contudo, foram encontradas evidências da presença de um gene homólogo ao *femA* em espécies de ECN, como *S. epidermidis*, *S. simulans*, *S. hominis* e *S. saprophyticus*, com um grau de homologia de 70 a 80% entre as sequências, quando comparadas à *S. aureus* (Alborn et al., 1996; Vannuffel et al., 1999). Apesar dessas evidências, Vannuffel et al. (1999) considera que é possível utilizar *femA* como gene-alvo nas reações de identificação de *S. aureus*, devido à diferenças nas sequências das diversas espécies do gênero.

Considerando ainda o total de isolados testados, 14 (15,7%) foram capazes de produzir enterotoxinas em níveis detectáveis pelo TECRA (3M Food Safety Inc.). Dentre os isolados produtores de enterotoxinas, 12 pertenciam ao grupo dos coagulase e termonuclease positivos; dos 2 isolados coagulase-negativos, 1 apresentou, no entanto, a

produção de termonuclease. Quanto à ocorrência de genes de enterotoxinas clássicas nos isolados produtores de enterotoxinas, o gene *sec* foi o mais observado (8/14), ocorrendo em concomitância com outros genes e também isoladamente (Tabela 7). Ainda, 2 isolados que não possuíam genes de enterotoxinas clássicas foram capazes de apresentar resultados positivos no ensaio imunoenzimático. No entanto, esses isolados possuíam genes para as demais enterotoxinas testadas, apresentando os genótipos *seg seh sei seq* e *seh sei seq* (Tabela 8). Isto pode indicar falhas na interpretação visual dos resultados no ensaio imunoenzimático ou, até mesmo, sugerir reações cruzadas entre as EEI e os anticorpos para enterotoxinas clássicas presentes no ensaio imunológico utilizado.

Resultados similares foram encontrados por Rosec, Guiraud, Dalet, Richard (1997) ao analisarem diversas categorias de alimentos, no qual foi demonstrado que 30,5% dos 213 isolados testados produziram enterotoxinas (SEA a SEE), porém em uma frequência menor (12,3%) nos isolados oriundos de queijos produzidos com leite cru. Em outro estudo realizado no Brasil, com amostras de leite cru, Fagundes, Barchesi, Nader Filho, Ferreira, Oliveira (2010) verificaram que 22% dos isolados produziram enterotoxinas. No entanto, a frequência de isolados enterotoxigênicos em derivados lácteos aparenta ser frequentemente maior do que a encontrada nos isolados deste estudo, sugerindo que a origem geográfica dos isolados influencia na capacidade de produzir enterotoxinas (De Buyser et al., 2001; Morandi, Brasca, Lodi, Cremonesi, Castiglioni, 2007; Normanno et al., 2005).

No protocolo de PFGE utilizado neste estudo, a digestão enzimática do DNA de isolados de estafilococos pela endonuclease *Sma*I revelou 9 a 16 fragmentos (Figura 5). Para a realização das análises de agrupamento (UPGMA), os isolados foram classificados segundo a capacidade de produção de coagulase. A partir de um coeficiente de similaridade de 90%, os *clusters* resultantes foram separados em pulsotipos e numerados com algarismos romanos.

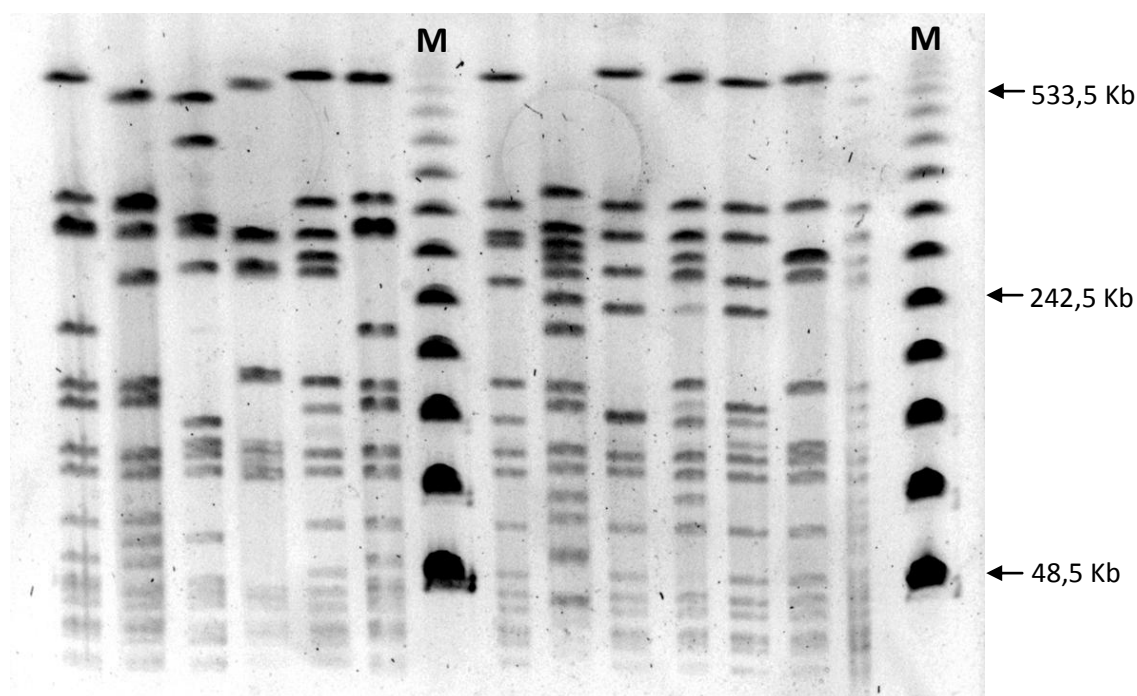


Figura 5. Exemplo de gel de PFGE contendo diferentes perfis de macrorrestrição pela endonuclease *SmaI* de isolados de estafilococos obtidos de amostras de leite cru e queijo frescal. M: marcador de peso molecular *Pulse Marker*TM 50-1,000 Kb (Sigma-Aldrich Inc.)

A Figura 6 representa o dendograma obtido para os 71 isolados coagulase-positivos encontrados neste estudo. De maneira geral, os isolados apresentaram uma variabilidade entre 65,2% e 100%, revelando 46 perfis distintos. Em um coeficiente de similaridade de 90%, observou-se a ocorrência de 16 pulsotipos (CP-PI a CP-PXVI), que abrigavam desde um até 30 isolados simultaneamente (CP-PIII).

Estudos sobre a variabilidade genética de estafilococos isolados de derivados lácteos no Brasil são muito escassos. Recentemente, Fagundes et al. (2010) observaram uma alta variabilidade dos isolados de *S. aureus* oriundos de leite cru no estado de São Paulo, onde verificaram 13 perfis de PFGE distintos em 18 isolados testados. De forma similar, Arcuri et al. (2010) revelaram a ocorrência de 65 perfis de PFGE distintos obtidos em 92 cepas de *S. aureus* isoladas de leite cru e queijo Minas Frescal, produzidos no estado de Minas Gerais. Já no estado de Goiás, as análises de PFGE realizadas em 71

isolados de *S. aureus* oriundos de queijo fresco e leite cru revelaram 34 perfis distintos, evidenciando a variabilidade dos isolados nessa região (André et al., 2008). Por fim, Tondo, Guimarães, Henriques, Ayub (2000) encontraram 42 perfis de PFGE ao analisarem 48 isolados de *S. aureus* de origens variadas dentro de uma planta de processamento de leite. Ainda no trabalho de Tondo et al. (2000), com base nos resultados obtidos com a técnica de PFGE, foi possível verificar que a fonte de contaminação do queijo produzido era o leite cru e não os manipuladores testados. Assim, os resultados obtidos na análise de PFGE deste presente estudo são comparáveis àqueles encontrados em estudos similares, inclusive em outros países (Aydin, Sudagidan, Muratoglu, 2011; Boerema, Clemens, Brightwell, 2006; Peles et al., 2007).

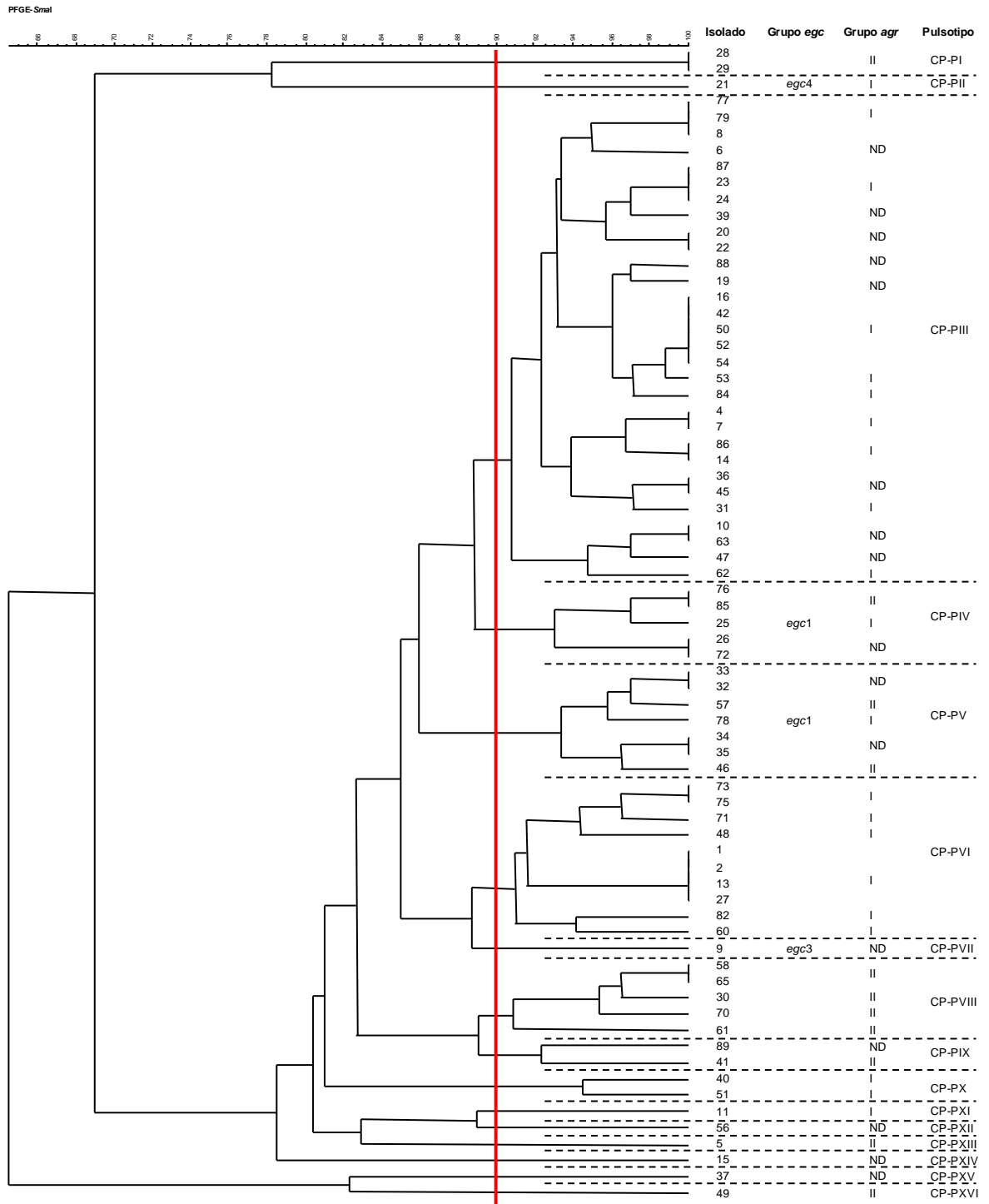


Figura 6. Dendrograma obtido considerando os perfis de PFGE de isolados de estafilococos coagulase-positivos oriundos de amostras de leite cru e queijo fresco, e identificação dos grupos *egc* e *agr* detectados. ND: grupo *agr* não determinado.

O agrupamento dos perfis de PFGE obtidos para os 18 isolados coagulase-negativos revelou uma variabilidade maior do que aquela observada para os isolados coagulase-positivos (52,8% a 100%), distribuídos em 17 perfis distintos. Quando analisados por um coeficiente de similaridade de 90%, os isolados coagulase-negativos foram distribuídos em 11 pulsotipos (CN-PI a CN-PXI), que eram constituídos na sua maioria por isolados individualizados, com exceção dos pulsotipos CN-PIII e CN-PIX (Figura 7).

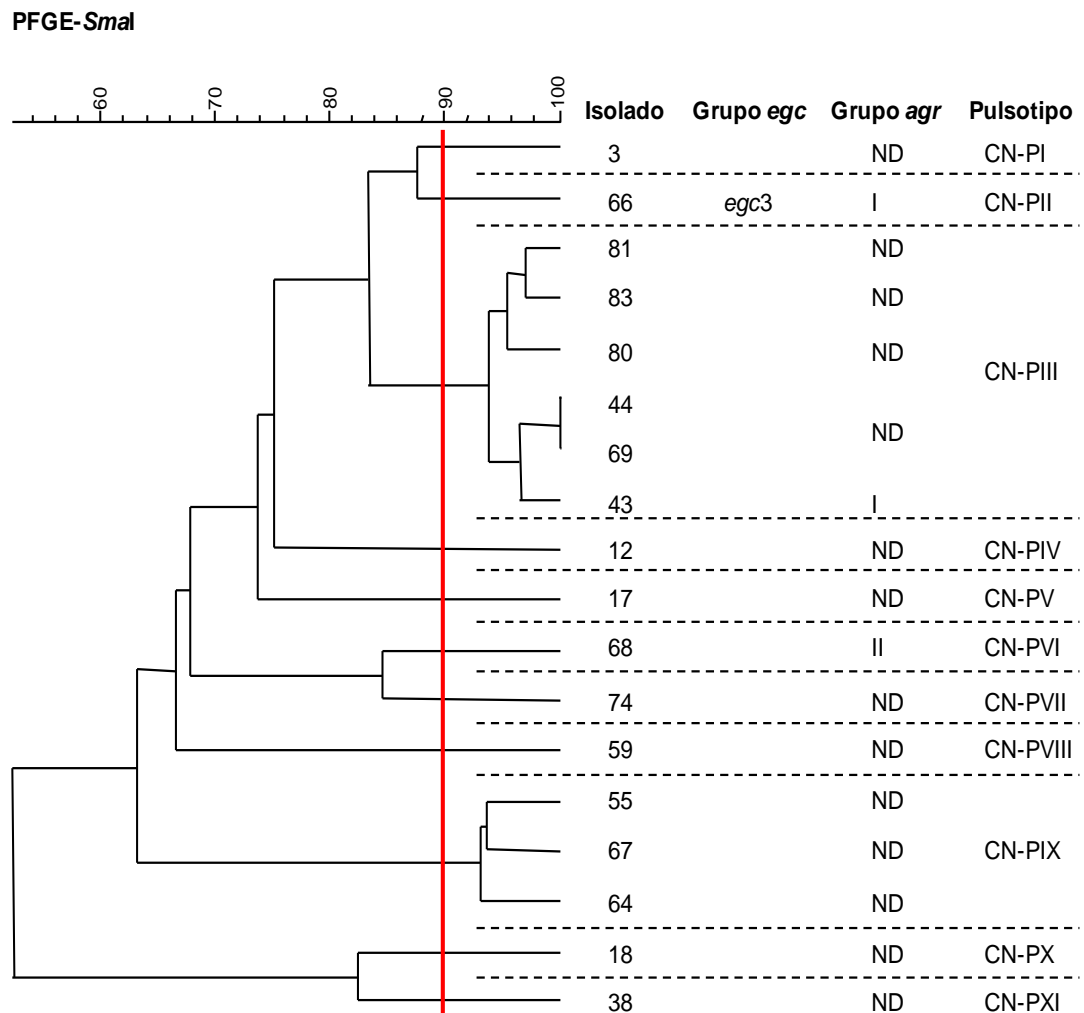


Figura 7. Dendrograma obtido considerando os perfis de PFGE de isolados de estafilococos coagulase-negativos oriundos de amostras de leite cru e queijo fresco, e identificação dos grupos *egc* e *agr* detectados. ND: grupo *agr* não determinado.

A PFGE é uma técnica aplicável e altamente reprodutível para a discriminação de isolados de ECN (Gillespie, Headrick, Boonyayatra, Oliver, 2009; Thorberg et al., 2006). Em um estudo realizado com ECN isolados de leite de ovelha, não foi observada relação entre os biotipos encontrados e os perfis de macrorrestrição por PFGE (Pilipčincová, Bhide, Dudriková, Trávniček, 2010). Outro estudo revelou que os perfis de PFGE obtidos para os isolados de ECN obtidos de amostras de alimentos não são similares aos perfis de ECN oriundos de amostras clínicas, e ainda observou-se que as espécies *S. equorum* and *S. xylosus*, majoritariamente presente em alimentos, não foram encontradas nas amostras clínicas (Coton et al., 2010).

Em relação ao potencial enterotoxigênico dos isolados, foi observado que somente 21,4% dos isolados que apresentavam ao menos um gene de enterotoxina clássica (*sea-see*) foram capazes de produzir enterotoxinas em nível detectáveis pelo TECRA. Esta frequência pode ser considerada muito baixa quando comparada a outros estudos (Aydin et al., 2011; Boerema et al., 2006; McLauchlin, Narayanan, Mithani, O'Neill, 2000). A diferença observada entre a presença de genes e a capacidade de produzir enterotoxinas pode ser explicada pela produção em níveis muito baixos, aquém do limite de detecção da técnica (Park et al., 1996). Outra possível justificativa é a expressão incompleta dos genes de enterotoxinas, que pode ocorrer devido à mutações pontuais que silenciam alguns genes (Okoji, Inglis, Stewart, 1993). Ainda, a expressão de enterotoxinas pode também ser afetada pelas condições ambientais, como temperatura, pH e atividade de água (Nájera-Sánchez, Maldonado-Rodríguez, Olvera, Garza, 2003). Além disso, estudos proteômicos recentes confirmam a grande variabilidade no perfil de expressão de diversos fatores de virulência por cepas de *S. aureus*, o que pode ser reflexo não somente da plasticidade do genoma, como também das possíveis diferenças que ocorrem nos mecanismos de regulação transcricional e traducional dentro de uma mesma espécie (Ziebandt et al., 2010).

Tabela 7. Frequência dos genótipos encontrados na pesquisa de genes para enterotoxinas clássicas e sua relação com a produção de enterotoxinas, coagulase e termonuclease.

Genótipo	n	Coagulase + (TECRA +)	Coagulase – (TECRA +)
ausente	33	29 (0)	4 (0)
<i>sea</i>	7	4 (0)	3 (0)
<i>sec</i>	3	2 (1)	1 (0)
<i>sed</i>	2	2 (0)	-
<i>see</i>	7	6 (2)	1 (1)
<i>sea seb</i>	2	2 (1)	-
<i>sea sec</i>	2	2 (0)	-
<i>sea sed</i>	1	1 (0)	-
<i>sea see</i>	5	3 (0)	2 (0)
<i>sec see</i>	3	2 (0)	1 (1)
<i>sea seb sec</i>	3	3 (2)	-
<i>sea seb see</i>	6	4 (0)	2 (0)
<i>sea sec see</i>	3	2 (1)	1 (0)
<i>seb sec see</i>	1	1 (1)	-
<i>sec sed see</i>	1	1 (1)	-
<i>sea seb sec see</i>	6	5 (0)	1 (0)
<i>sea seb sec sed see</i>	4	2 (1)	2 (0)

Quanto à pesquisa de genes de enterotoxinas, foi observado que todos os isolados apresentaram ao menos um dos genes pesquisados. Além disso, 56 (62,9%) isolados apresentaram ao menos um dos genes de enterotoxinas clássicas, sendo *sea* (39/89) e *see* (35/89) os genes mais representados. Nenhum dos genes pesquisados ocorreu de forma isolada, o que gerou 59 genótipos distintos, dos quais os mais frequentemente observados foram *seg seh sei sem seo seq* (5/89) e *seh sei sem seo seq* (5/89) (Tabela 8).

Considerando somente os isolados coagulase-positivos, os genes de enterotoxinas clássicas mais frequentemente observados foram *sea* (28/71) e *see* (26/71), enquanto que para as EEI ocorreu uma maior frequência dos genes *sei* (70/71) e *seh* (69/70). Não foi observada a presença de *sek* nos isolados coagulase positivos, com baixíssima ocorrência de *sel* (4/71) e *sed* (6/71). A ocorrência de genes de enterotoxinas

nos isolados coagulase-negativos foi semelhante ao observado para os coagulase-positivos, com ocorrência de *seh* e *sei* em todos os 18 isolados, com predominância de *sea* (11/18) e *see* (9/18) dentre as enterotoxinas clássicas. Em outro estudo envolvendo alimentos de origens variadas, verificou-se que 51,4% dos isolados de ECN foram capazes de produzir enterotoxinas SEA-SEH (Zell et al., 2008).

Tabela 8. Genótipos definidos a partir da presença de genes de enterotoxinas em cepas de *Staphylococcus* spp. isoladas de amostras de leite cru e queijo frescal.

Genótipos	Frequência (n)
<i>seg seh sei sem seo seq</i>	5
<i>seh sei sem seo seq</i>	5
<i>sea seb see seg seh sei sej sem sen seo seq seu</i>	4
<i>see seg seh sei sem sen seo seq</i>	4
<i>seh sei sem sen seo seq</i>	4
<i>seg seh sei sem sen seo seq</i>	3
<i>seh sei seq</i>	3
<i>sea seb sec sed see seg seh sei sej sek sel sem sen seo seq seu</i>	2
<i>sea seb sec sed see seg seh sei sej sem sen seo seq seu</i>	2
<i>sea seb sec see seg seh sei sem sen seo seq seu</i>	2
<i>sec seg seh sei sem sen seo seq</i>	2
<i>sed seh sei sem seo seq seu</i>	2
<i>see seh sei sem sen seo seq</i>	2
<i>seg seh sei seq</i>	2
<i>sea see seh sei</i>	2
<i>sea seb sec see seg seh sei sej sel sem sen seo seq seu</i>	1
<i>sea seb sec see seg seh sei sej sem sen seo seq seu</i>	1
<i>sea seb sec see seg seh sei sej sem sen seo seu</i>	1
<i>sea seb seg seh sei sej sem sen seo seq seu</i>	1
<i>sea seb sec seg seh sei sem sen seo seq seu</i>	1
<i>seb sec see seg seh sei sem sen seo seq seu</i>	1
<i>sea sec see seg seh sei sem sen seo seq seu</i>	1
<i>sea seb see seg seh sei sem sen seo seq seu</i>	1
<i>sea seb sec seg seh sei sej sem sen seo seq</i>	1
<i>sea sec seg seh sei sej sem sen seo seq seu</i>	1
<i>sea see seg seh sei sem sen seo seq seu</i>	1

Continuação da Tabela 8.

Genótipos	Frequência (n)
<i>sea seb seg seh sei sem sen seo seq seu</i>	1
<i>sea seb sec seh sei sej sem sen seo seq</i>	1
<i>sea seb see seg seh sei sem sen seo seq</i>	1
<i>sea see seg seh sei sej sem seo seq seu</i>	1
<i>sec see seg seh sei sem sen seo seq seu</i>	1
<i>sea seb sec see seh sei sel sen seu</i>	1
<i>sea seg seh sei sem sen seo seq seu</i>	1
<i>sea seg seh sei sel sem sen seo seu</i>	1
<i>see seh sei sem sen seo seq seu</i>	1
<i>sec see seh sei sem sen seo seq</i>	1
<i>sea seg seh sei sem seo seq seu</i>	1
<i>sea see seh sei sem sen seo seq</i>	1
<i>sec seh sei sem sen seo seq seu</i>	1
<i>sea sed seg seh sei sen seo seq</i>	1
<i>sec sed see seh sei sem seo seq</i>	1
<i>seg seh sei sem sen seo seq seu</i>	1
<i>sea seg seh sei sem seo seq</i>	1
<i>sea seh sei sem seo seq seu</i>	1
<i>sea seh sei sem sen seo seq</i>	1
<i>sec see seh sei sem seo seq</i>	1
<i>sea seg seh sei sem sen seo</i>	1
<i>seg seh sei sej sem sen seo</i>	1
<i>seg seh sei sem seo seq seu</i>	1
<i>seg seh sei sem sen seo</i>	1
<i>seh sei sem seo seq seu</i>	1
<i>sea sec see seg seh sei</i>	1
<i>sei sem sen seo seq</i>	1
<i>sea sec seh sei sen</i>	1
<i>seh sei sel seq</i>	1
<i>seh sei sem seo</i>	1
<i>sea sec see seh</i>	1
<i>seh sei sen</i>	1
<i>sei seq</i>	1
TOTAL	59

A elevada frequência de isolados enterotoxigênicos já foi relatada em outros estudos. Srinivasan et al. (2006) pesquisaram a ocorrência de genes de enterotoxinas clássicas e EEI em isolados de *S. aureus* de leite mastítico e observaram que 93,6% dos isolados apresentaram ao menos um dos genes pesquisados. De forma similar, Chiang et al. (2008) relataram a ocorrência de genes de diversas enterotoxinas em 91,8% dos isolados de *S. aureus* obtidos de fezes e vômitos de pacientes associados com intoxicações alimentares. Em outro estudo realizado em 108 isolados clínicos de diferentes regiões da China, foi observado que 90,7% dos isolados apresentaram ao menos um dos genes de toxinas pesquisados, que incluíram 18 genes de enterotoxinas e 3 genes de exotoxinas exfoliativas (Xie et al., 2011).

Ainda neste estudo, foi possível observar que os genes de enterotoxinas clássicas estavam acompanhados por ao menos um dos genes de EEI (Tabela 9), como igualmente descrito por Bania et al. (2006). Por outro lado, em grande parte dos isolados que possuíam genes de EEI, não foi observada a presença concomitante dos genes de enterotoxinas clássicas (*sea-see*), como já relatado anteriormente em estudos similares (Akineden et al., 2001; Bania et al., 2006; Blaiotta et al., 2004; Rosec et al., 2002). No entanto, Oh et al. (2011) verificaram que 95% dos isolados de *S. aureus* carreadores de genes de enterotoxinas clássicas também apresentavam genes de EEI.

Tabela 9. Frequência de genes das enterotoxinas estafilocócicas *seg* a *seu* agrupados de acordo com os genótipos de enterotoxinas clássicas (*sea-see*) apresentados por isolados de *Staphylococcus* spp. oriundos de leite cru e queijo fresco.

Genótipos de enterotoxinas clássicas	n	<i>seg</i>	<i>seh</i>	<i>sei</i>	<i>sej</i>	<i>sek</i>	<i>sel</i>	<i>sem</i>	<i>sen</i>	<i>seo</i>	<i>seq</i>	<i>seu</i>
<i>sea</i>	7	5	7	7	0	0	1	7	5	6	5	4
<i>sec</i>	3	1	3	3	0	0	0	3	3	3	3	1
<i>sed</i>	2	0	2	2	0	0	0	2	0	2	2	2
<i>see</i>	7	4	7	7	0	0	0	7	7	7	7	1
<i>sea seb</i>	2	2	2	2	1	1	0	2	2	2	2	2
<i>sea sec</i>	2	1	2	2	1	0	0	1	2	1	1	1
<i>sea sed</i>	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0
<i>sea see</i>	5	2	5	5	1	0	0	3	2	3	3	2
<i>sec see</i>	3	1	3	3	0	0	0	3	2	3	3	1
<i>sea seb sec</i>	3	2	3	3	2	0	0	3	3	3	3	1
<i>sea seb see</i>	6	6	6	6	4	0	0	6	6	6	6	5
<i>sea sec see</i>	3	2	3	2	0	0	0	1	1	1	1	1
<i>seb sec see</i>	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1
<i>sec sed see</i>	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	1	0
<i>sea seb sec see</i>	6	6	6	6	3	0	1	6	6	6	4	6
<i>sea seb sec sed see</i>	4	4	4	4	4	1	2	4	4	4	4	4
ausentes	33	13	31	33	1	0	1	23	11	25	30	3

No presente estudo, todos os isolados positivos para *seg* também apresentaram *sei* (n=51), porém 38 isolados positivos para *sei* não continham *seg* (Tabela 8). Ainda que *seg* e *sei* coexistam no mesmo elemento genético móvel, como descrito por Jarraud et al. (2001), *sei* também pode ocorrer de forma independente de *seg* em isolados de estafilococos provenientes de amostra de alimentos. Em estudo realizado por McLauchlin, Narayanan, Mithani, O'Neill (2000), 19 isolados possuíam a combinação *seg* e *sei*,

enquanto que a ocorrência isolada de *sei* foi observada em 1 isolado. Este mesmo dado foi corroborado por Aydin et al. (2011), que encontraram 28 isolados positivos para *seg* e *sei*, enquanto 3 isolados apresentaram somente *sei*. No presente estudo, a frequência de *sei* independentemente de *seg* demonstrou-se muito mais elevada, reforçando a hipótese de que *sei* possa existir em outro elemento genético no qual não haja a presença de *seg*.

Alguns autores sugeriram que *seg* e *sei* podem estar associados à *S. aureus* isolados de vacas mastíticas e leite cru (Arcuri et al., 2010; Omoe et al., 2002). Apesar da comprovada capacidade emética de SEG e SEI, estudos relatam que essas proteínas não são produzidas em níveis passíveis de serem detectadas por testes imunológicos comuns (Jarraud et al., 2001; Munson et al., 1998; Omoe et al., 2002), colocando em questão o papel dessas enterotoxinas na ocorrência de surtos de intoxicações alimentares. Considerando ainda que *seg* e *sei* são constituintes do *locus egc*, e que esses genes são transcritos em um único mRNA policistrônico, Omoe (2002) sugeriram que SEG e SEI podem ser reguladas em nível traducional, o que explicaria a produção em concentrações tão baixas.

Os genes mais comumente detectados no presente estudo foram *sei* (98,9%) e *seh* (97,8%). Ambos os genes ocorreram em concomitância com os demais genes pesquisados, na maioria das vezes com genes de enterotoxinas clássicas (Tabela 9), o que foi relatado em outros estudos similares (Chen, Chiou, Tsen, 2004; Fueyo, Mendoza, Alvarez, Martin, 2005; Ruzickova et al., 2008). No entanto, o genótipo *seh*, *sei* e *sen* foi observado em apenas um isolado do presente estudo, enquanto *sei* ocorreu associado somente com *seg* em outro isolado (Tabela 8).

A elevada ocorrência de *seh* em isolados de *Staphylococcus* spp. provenientes de amostras de alimentos já foi observada em outros estudos (Omoe et al., 2002; Rosec et al., 2002; Sakai et al., 2008), inclusive em associação com o *locus egc* (Fueyo et al., 2005). Esta toxina já foi envolvida em surtos de intoxicação alimentar, tendo ocorrido de forma isolada (Jorgensen et al., 2005), como também em associação com SEA (Ikeda et

al., 2005) e SED (Pereira et al., 1996). SEH foi inicialmente descrita por Ren et al. (1994) e posteriormente purificada por Su, Wong (1995), os quais foram responsáveis por demonstrar a estrutura e capacidade emética dessa proteína. Além disso, SEH é considerada um potente indutor mitótico de células T humanas (Nilsson, Björk, Dohlsten, Antonsson, 1999), apesar de não interagir com receptores de células T de camundongos (Pettersson, Forsberg, 2002).

Baba et al. (2002) verificaram a localização de *seh* em um elemento genético móvel que se insere próximo ao cassete cromossomal SCC*mec* tipo IV, e Noto et al. (2006) concluíram que a presença de *seh* poderia ser o fator responsável pela integração e estabilização do gene de resistência à meticilina no cromossomo de *S. aureus*. Quanto à regulação de *seh*, estudos anteriores sugeriram que este gene poderia estar sob regulação do sistema *agr* (Derzelle et al., 2009; Omoe et al., 2002). No entanto, um estudo recente abordou detalhadamente os perfis de expressão desta toxina em nível transcricional e protéico. Os autores concluíram que *seh* é ativado no início da fase exponencial da multiplicação bacteriana, com redução dos transcritos ao final da fase estacionária, o que é muito similar ao padrão seguido por *sea*. Além disso, foi observada uma grande variabilidade na produção de SEH entre as culturas testadas, com concentrações variando de 20 ng/mL até 100 ng/mL (Lis, Podkowik, Bystron, Stefaniak, Bania, 2012). Alguns ensaios imunológicos foram desenvolvidos com o objetivo de detectar SEH em amostras de alimentos (Sakai et al., 2008; Su, Wong, 1996), porém não há nenhum método disponível oficialmente para comercialização. Diante da elevada frequência de *seh* em isolado de estafilococos, aliada à comprovada capacidade enterotoxigênica desta toxina, esforços devem ser direcionados para a regulamentação de novos *kits* de detecção para esta e outras proteínas, de forma a determinar o impacto dessas toxinas recém-descritas no surgimento de casos e surtos de intoxicações alimentar.

O gene menos frequente neste estudo foi representado por *sek* (2,2%). Os 2 isolados *sek*-positivos apresentaram concomitantemente todos os outros genes pesquisados (Tabela 8). A ocorrência de *sek* em conjunto com outras enterotoxinas já foi demonstrada, como *sel* e *sec* na ilha de patogenicidade SaPI4 (Novick, 2003a), e também com *seb* em SaPI3 (Fitzgerald et al., 2001). A presença de *sek* em associação com *seq* também foi demonstrada em isolados de *S. aureus* obtidos de produtos cárneos (Bania et al., 2006). Além disso, o sequenciamento completo da cepa *S. aureus* Mu50 revelou que *sek* está localizado em uma ilha de patogenicidade (SaPI1) próxima ao sítio de integração do prófago ΦMu50A, o que pode justificar a ocorrência de ambos os genes (Kuroda et al., 2001; Oh et al., 2011). Portanto, é possível que os isolados *sek*-positivos deste estudo sejam carreadores de múltiplas ilhas de patogenicidade, o que evidencia o potencial enterotoxigênico desses isolados.

Os genes *sed* e *sej* estão localizados no mesmo plasmídeo (Zhang et al., 1998) e demonstram ocorrer de forma associada com frequência (Akineden et al., 2001; Scherrer, Corti, Muehlherr, Zweifel, Stephan, 2004), inclusive em combinação com outros genes, como já observado com o *egc* e SaPIbov (Smyth et al., 2005). A ocorrência de *sed* e *sej* foi observada em quatro isolados deste estudo, distribuídos nos genótipos *sea seb sec sed see seg seh sei sej sek sel sem sen seo seq seu* e *sea seb sec sed see seg seh sei sej sem sen seo seq seu*, confirmando a ocorrência destes genes em associações com os demais genes de enterotoxinas clássicas e também EEI.

Quanto à presença do *locus egc* nos isolados deste estudo, observou-se que somente 5 (5,6%) isolados foram positivos aos testes utilizados (Tabela 10). Entretanto, apesar de não terem sido confirmados pelo protocolo de RFLP-PCR utilizado neste estudo, a presença do *locus egc* pode ser sugerida em 36 dos 89 isolados pesquisados, pelo fato de apresentarem a combinação exata dos genes constituintes do *cluster*, como verificado nas reações de PCR (Tabela 8). Isto pode sugerir que os *primers* utilizados no

protocolo de RFLP-PCR para a detecção do *locus egc* sejam mais específicos do que aqueles utilizados na amplificação independente dos mesmos genes presentes no *cluster*.

Tabela 10. Características bioquímicas e genotípicas dos cinco isolados caracterizados como *egc* positivos segundo o protocolo de RFLP-PCR.

Isolado	Coagulase	TNase	TECRA ^a	<i>sea-see</i> ^b	<i>seg-seu</i> ^b
9	+	+	-	<i>sea seb sec see</i>	<i>seg seh sei sej sel sem sen seo seq seu</i>
21	+	+	-	-	<i>seg seh sei sem sen seo seq seu</i>
25	+	+	-	<i>sea seb sec see</i>	<i>seg seh sei sej sem sen seo seu</i>
66	-	-	-	<i>sea seb sec sed see</i>	<i>seg seh sei sej sek sel sem sen seo seq seu</i>
78	+	+	-	<i>sea seb see</i>	<i>seg seh sei sem sen seo seq seu</i>

^a Ensaio imunoenzimático

^b Presença de genes de enterotoxinas estafilocócicas detectados por PCR.

Ainda, foi possível observar a presença incompleta do *locus egc* em inúmeros isolados deste estudo (Tabela 8), como já relatado anteriormente (Blaiotta et al., 2004; Collery et al., 2009; Elazhari et al., 2011; Thomas et al., 2006; Zocche, Bastos, da Silva, 2010). Isto pode ocorrer devido à mutações pontuais nos genes constituintes do *egc*, como também pode ser causado pela presença isolada destes genes em outros elementos genéticos móveis (Elazhari et al., 2011). Além disso, a região intergênica *sei-sen* revelou ser um local potencial para a inserção de sequências exógenas, como cassetes e transposases, o que contribui ainda mais para o polimorfismo do *locus egc* (Thomas et al., 2006).

A ocorrência do *locus egc* é pouco documentada em estafilococos isolados de amostras de alimentos. O primeiro relato foi descrito por Blaiotta et al. (2004), que verificaram a baixa frequência (10,1%) do *egc* em estafilococos isolados de produtos

cárneos e derivados lácteos. Posteriormente, Lawrynowicz-Paciorek, Kochman, Piekarska, Grochowska, Windyga (2007) relataram a presença do *egc* em 42% dos estafilococos isolados de alimentos variados, que eram pertencentes em sua maioria ao grupo *egc1*. No entanto, em outro estudo mais recente, o *locus egc* foi detectado em 64,2% dos isolados de *S. aureus* provenientes de órgãos internos de aves, com predominância de 96% do grupo *egc1* (Bystron et al., 2010). Esses dados revelam uma frequência variada na ocorrência do *egc* em *S. aureus* isolados de alimentos, o que pode estar relacionado com a técnica de detecção utilizada, como também com a origem desses isolados.

Em outro estudo mais recente, a ocorrência do *egc* (29,5%) foi maior do que aquela encontrada para os genes de enterotoxinas clássicas pesquisados em 336 isolados provenientes de alimentos diversos, com predominância do grupo *egc1* (92,9%) (Zhang et al., 2013). Ainda, o perfil de expressão dos genes constituintes do *locus egc* foi avaliado por qRT-PCR, que demonstrou um acúmulo maior dos transcritos do *egc* ao final da fase exponencial da curva de multiplicação bacteriana, o que também foi observado para *sea*, *seb* e *sed*. Apesar de serem considerados superantígenos (Jarraud et al., 2001), as enterotoxinas constituintes do *egc* são capazes de alterar o sistema imunológico de maneira distinta das demais enterotoxinas, o que pode estar relacionado à fase em que são secretadas (Grumann et al., 2008). Ainda, um estudo revelou pela primeira vez a ocorrência das enterotoxinas SEIL e SeIP em nível protéico, enquanto que as enterotoxinas do *locus egc* não foram detectadas nas mesmas condições (Pocsfalvi et al., 2008), o que demanda estudos mais aprofundados sobre a regulação em nível traducional dessas toxinas.

Estudos sobre a ocorrência do *egc* em amostras clínicas revelam que a alta frequência deste *cluster* nos isolados de estafilococos pode conferir uma vantagem competitiva, como sugerido para os isolados de origem bovina (Jarraud et al., 2001; Smyth et al., 2005). Mempel et al. (2003) verificaram que 48% dos isolados

enterotoxigênicos de *S. aureus* oriundos de pacientes com eczema atópico apresentavam o *locus egc*. Outros estudos relataram a alta frequência do *egc* em *S. aureus* isolados de animais (Smyth et al., 2005), e em seres humanos acometidos por bacteremias (Becker et al., 2003; Becker, Friedrich, Peters, von Eiff, 2004), lesões supurativas e carreadores assintomáticos (Thomas et al., 2006).

Posteriormente, com o objetivo de confirmar os resultados obtidos no RFLP-PCR, os produtos de PCR positivos para *egc* dos cinco isolados que apresentaram resultados positivos para esse gene foram submetidos ao sequenciamento genético com os *primers* PSE1/PSE4. As sequências obtidas foram comparadas com sequências previamente depositadas no banco de dados do NCBI, através do *GenBank*. Considerando as sequências geradas, foi possível confirmar a natureza do *locus egc* presente em quatro isolados. No entanto, um dos isolados inicialmente caracterizado como *egc1*, foi reclassificado como pertencente ao grupo *egc4*, com base na sequência obtida (Tabela 11).

Tabela 11. Comparação dos dados do sequenciamento parcial do *locus egc* de cinco isolados de estafilococos provenientes de leite cru e queijo frescal com as sequências-referência depositadas no banco de dados do NCBI.

Isolado	Tamanho do fragmento obtido (pb)	Cepa-referência de <i>S. aureus</i> (n° de acesso no <i>GenBank</i>)	Observações	Grupo <i>egc</i>
25	1026	Mu50 (BA000017.4) ^c	100% de homologia	1
78		N315 (BA000018.3) ^c		
9	786	382F (AY158703) ^a	100% de homologia	3
66		MRSA252 (BX571856) ^b		
21	1026	A900624 (EF030428) ^d	#111: T→C #425: C→T	4

^aLetertre et al. (2003b); ^bHolden et al. (2004); ^cKuroda et al. (2001); ^dThomas et al. (2006).

A incapacidade de distinção entre os isolados do grupo *egc1* e *egc4* pelo uso das endonucleases *BbvI* e *TseI* no protocolo de RFLP-PCR já foi anteriormente verificada (Collery et al., 2009), e é explicada pela alta similaridade entre ambas as sequências, que diferem entre si em apenas um único nucleotídeo. Ao compararem a ocorrência do *egc* em diversos isolados clínicos, Thomas et al. (2006) observaram a existência de duas ORF's desconhecidas na cepa A900624, denominadas de ORF5 e ORF6. A análise da sequência da ORF5 revelou 99% de identidade com a porção 5' do gene *sem*, e quase 100% de identidade com a porção 3' do gene *sei*, o que sugeriu a ocorrência de um evento de recombinação, sendo renomeada para *selv*, e a proteína correspondente *SEV*. Em relação à ORF6, foi verificado que a primeira parte da sequência apresentou 99,3% de identidade com o pseudogene *Ψent1* presente na cepa Mu50, enquanto que a segunda parte era 100% idêntica à porção do pseudogene *Ψent2* da mesma cepa. Quando comparada à sequência original do pseudogene *Ψent1*, a ORF6 apresentava a deleção de uma adenosina (A365), que foi responsável por retirar o códon de parada do quadro de leitura, gerando um produto protéico de 256 aminoácidos resultante da fusão entre ambos os pseudogenes. Devido ao alto grau de identidade deste peptídeo com *SEU*, a ORF6 foi designada *selu2*, e a proteína corresponde *SEU2*. Ainda, foram localizadas possíveis sequências Shine-Dalgarno para ambos os genes descritos, bem como foi possível comprovar a transcrição desses genes através da RT-PCR.

Collery et al. (2007) descreveram a ausência de 69 nucleotídeos na sequência do *egc* da cepa *S. aureus* A900322, utilizada por Jarraud et al. (2001) no primeiro relato sobre a ocorrência do *egc*. Esta sequência (*GenBank*: AF285760), quando comparada às sequências das cepas de *S. aureus* Mu50 e N315, apresenta a deleção dos nucleotídeos presentes no intervalo G3462 a G3463, o que foi confirmado por um sequenciamento do mesmo fragmento nesta mesma cepa pelos autores que verificaram essa alteração. A presença desses 69 nucleotídeos também foi observada nos isolados *egc1* deste estudo,

o que corrobora a idéia de que podem ter ocorrido erros de anotação na sequência AF285760 depositada por Jarraud et al. (2001).

Chini et al. (2006) e Collery et al. (2007) demonstraram o uso do RFLP-PCR com as endonucleases *HindIII*, *HphI* e *BclI* para a distinção dos isolados contendo os pseudogenes Ψ_{ent1} e Ψ_{ent2} , daqueles que contenham *selu* ou *selu_v*. Posteriormente, Collery et al. (2009) mostraram a validade da mesma técnica de RFLP-PCR na diferenciação dos grupos *egc2* (*selu*) e *egc3* (*selu_v*). Alternativamente, Blaiotta, Fusco, von Eiff, Villani, Becker (2006) elaboraram um protocolo de detecção de polimorfismos na sequência do *egc*, através do uso da amplificação de um fragmento de 3.375 pb correspondente a 65% da sequência completa do *egc*, combinada à utilização das endonucleases *EcoRI*, *AluI*, *TaqI* e *CfoI*, o que resultou na ocorrência de sete perfis distintos. Contudo, ao contrário desta última metodologia, os protocolos utilizados no presente estudo apresentam a vantagem de prover uma análise específica das diferenças que ocorrem nas regiões intergênicas de interesse do *locus egc* (*sei-sen*) (Collery et al., 2007; Collery et al., 2009). Mais recentemente, demonstrou-se a utilização da técnica de RT-PCR na detecção do *egc*, com 100% de especificidade e acurácia, o que demonstra ser uma alternativa segura ao método convencional de cultivo microbiológico seguido de detecção por PCR (Fusco, Quero, Morea, Blaiotta, Visconti, 2011).

Apesar de diversos trabalhos demonstrarem a ocorrência dos genes comumente encontrados no *locus egc* (*seg*, *sei*, *selm*, *seln*, *selo*, *selu*) em isolados de estafilococos de origens variadas, ainda são poucos os relatos sobre a ocorrência dos pseudogenes Ψ_{ent1} e Ψ_{ent2} , *selu*, *selu_v* e *selu₂* na constituição deste *cluster*. O protocolo de RFLP-PCR usado neste estudo mostrou-se adequado na diferenciação dos quatro grupos *egc*, classificados segundo a presença dessas sequências. Contudo, foi possível observar discrepâncias entre a frequência de isolados *egc*-positivos obtida através do uso do RFLP-PCR e os genótipos obtidos pela PCR convencional. Ainda, foi observado que a diferenciação dos isolados que apresentavam Ψ_{ent1} e Ψ_{ent2} daqueles que possuíam

selu2 foi definida com base somente no sequenciamento genético, o que evidencia a necessidade de se desenvolver um protocolo único que permita diferenciar simultaneamente os quatro grupos *egc*.

Considerando o agrupamento genético obtido pela macrorestrição com a enzima *SmaI* (Figuras 6 e 7), não foi verificada relação com a presença ou não do *egc*, assim como os tipos identificados. Da mesma forma, não foi verificada associação entre os genótipos encontrados para os genes de enterotoxinas pesquisados e a distribuição dos perfis de PFGE dentre os isolados deste estudo. Tal observação também foi encontrada por Xie et al. (2011) ao analisarem isolados de *S. aureus* oriundos de amostras clínicas, como também por Ruzickova et al. (2008) e (Gouloumès et al., 1996) em isolados de alimentos. Isto pode ser explicado pela alta diversidade genética dos isolados verificada em ambos os métodos utilizados. Ainda, é necessário reforçar que a PFGE é uma técnica baseada na macrorrestrição do genoma completo, e sua limitação em detectar pequenas alterações pode estar relacionada a ausência de polimorfismos nas sequências suscetíveis à clivagem enzimática.

Para a determinação do *agr*, 55 isolados foram selecionados a partir dos perfis obtidos por PFGE e submetidos ao sequenciamento parcial do *locus agr*, com o objetivo de também verificar possíveis associações entre as características pesquisadas neste estudo. Até o presente momento, foi possível estabelecer o grupo *agr* de 41 isolados através das sequências obtidas, distribuídos em *agrI* (68,3%) e *agrII* (31,7%). Jarraud et al. (2002) relataram que cepas de estafilococos capazes de causar intoxicações alimentares pertencem ao grupo *agrI* ou *agrII*, sugerindo uma evolução concomitante dos genes de enterotoxinas com os diferentes alelos do *agr*. No entanto, é importante ressaltar que há poucos estudos sobre a caracterização de grupos *agr* em isolados de *S. aureus* obtidos de amostras de alimentos, apesar de ser amplamente utilizado na identificação de isolados de amostras clínicas e/ou leite mastítico.

As sequências obtidas foram alinhadas com sequências-referência previamente depositadas no banco de dados do NCBI (*GenBank*). Comparando os 957 nucleotídeos da sequência-consenso dos isolados do grupo *agrI* com a sequência-referência (AJ617714.1), foram encontradas 21 diferenças, compostas por substituição de bases. Os isolados do grupo *agrII* apresentaram 950 bases na sequência-consenso, que quando comparadas à sequência-referência (AF001782.1), foram observadas 6 diferenças, incluindo substituições, uma deleção e uma inserção. A passagem seriada *in vitro* pode aumentar a diversidade genética dos isolados manipulados, através do acúmulo de mutações, deleções e inserções no DNA ou alterações nas sequências repetitivas (Somerville et al., 2002). A instabilidade do *locus agr* já foi demonstrada, e essas mutações podem resultar na ocorrência de genes truncados, com inativação do sistema de *quorum sensing*, diminuição na virulência e aumento expressivo da multiplicação bacteriana (McNamara, landolo, 1998; Somerville et al., 2002).

Não foi observada a ocorrência de associação entre grupos *agr*, perfis obtidos na PFGE e/ou genótipo de enterotoxinas (Figuras 6 e 7), assim como observado por Xie et al. (2011), Argudin et al. (2009), Traber et al. (2008) e Peerayeh, Azimian, Nejad, Kashi (2009) ao analisarem populações de estafilococos provenientes de amostras clínicas. No entanto, diversos estudos apontam a associação de grupos *agr* a grupos clonais com origens específicas (Ben Ayed, Boutiba-Ben Boubaker, Samir, Ben Redjeb, 2006; Jarraud et al., 2002; Lindsay, Holden, 2006). Ji et al. (1997) sugeriram que a divergência do *locus agr* ocorreu devido ao acúmulo de mutações aleatórias através de um mecanismo desconhecido, seguido da seleção das combinações mais adaptadas à diferentes hospedeiros e/ou doenças. Jarraud et al. (2002) sugerem que uma associação entre alelos de *agr*, genes de toxinas e características genéticas particulares permite a ativação mais eficiente dos fatores de virulência. Nesse sentido, Vautor et al. (2007) observaram que 80% dos isolados de *S. aureus* provenientes de leite de ovelhas com mastite pertenciam ao grupo *agr III*, o que revela também a possibilidade de associação com o

hospedeiro de origem. A hipótese de relação com hospedeiro também foi verificada em outro estudo envolvendo *S. aureus* isolados de leite de vacas mastíticas pela técnica de MLST, no qual foi verificada a existência de um perfil de fatores de virulência associados a cada clone, o que conferiria especificidade ao hospedeiro (Smith et al., 2005). Ainda, Chini et al. (2006) observaram uma relação clonal entre os grupos *agr* e o perfil de genes de toxinas, incluindo o *locus egc*, em isolados de *S. aureus* de pacientes hospitalizados.

Não há evidências de transferência horizontal do *agr* entre diferentes espécies de *Staphylococcus*, o que permite concluir que os alelos de *agr* evoluíram conjuntamente com as espécies hospedeiras. No entanto, os genes de enterotoxinas estafilocócicas estão associados com elementos genéticos móveis, e desta forma, podem ser transferidos horizontalmente entre cepas de *S. aureus*, e até mesmo para outras espécies. Ao contrário dos plasmídeos, as ilhas de patogenicidade não apresentam disseminação autônoma, porém quando associada à profagos, podem adquirir a capacidade de serem excisadas e encapsuladas, em um mecanismo que sugere-se ser o responsável pela transferência dessas partículas (Novick, 2003a).

Apesar da alta frequência de genes de enterotoxinas encontrada nos isolados deste estudo, e também da alta variabilidade dos genótipos apresentados, faz-se necessário reforçar a idéia de que isto não é determinante na capacidade de produção de enterotoxinas. Mesmo considerando a utilização dos testes de detecção de enterotoxinas, isso não implica que os isolados envolvidos possam ser capazes de produzir toxinas em níveis suficientes para causar a doença (Chiang et al., 2008).

Considerando a elevada frequência dos genes de EEI observada nos isolados deste estudo, representados principalmente por *seh* e *sei*, remetem à problemas como a ausência de *kits* comerciais para a detecção dessas proteínas, o que subestima o potencial enterotoxigênico dos isolados e dificulta as investigações de surtos de intoxicação alimentar.

Além disso, a produção de enterotoxinas por *S. intermedius* e *S. hyicus* já foi demonstrada, tendo sido verificado que essas espécies apresentam a capacidade de causar intoxicações alimentares (Adesiyun et al., 1984; Khambaty et al., 1994). Genes responsáveis pela codificação de enterotoxinas foram detectados em ECN isolados de derivados lácteos e manipuladores de alimentos, como *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. saprophyticus*, *S. xylosus* e *S. warneri* (Udo, Al-Bustan, Jacob, Chugh, 1999; Vernozy-Rozand et al., 1996).

Considerando essas evidências, os critérios de avaliação de intoxicações estafilocócicas no Brasil, bem como os limites previstos na legislação brasileira, devem ser avaliados uma vez que a utilidade dos testes bioquímicos de coagulase e termonuclease como indicadores do potencial enterotoxigênico de estafilococos deve ser questionada, propondo novas estratégias com o objetivo de maximizar a acurácia dos resultados.

Até o presente momento, e diante dos resultados obtidos neste e em outros estudos, não há um marcador genético ou fenotípico que esteja idealmente correlacionado com a capacidade enterotoxigênica de isolados de estafilococos provenientes de amostras de alimentos, necessitando concentrar maiores esforços em estudos dessa natureza.

CONCLUSÕES

- ✓ Os isolados de estafilococos foram majoritariamente classificados como coagulase e termonuclease positivos, ainda que tenham ocorrido exceções à essa associação;
- ✓ A produção de enterotoxinas estafilocócicas foi pouco pronunciada;
- ✓ A correspondência entre a presença de genes de enterotoxinas clássicas (*sea-see*) e a produção de enterotoxinas foi considerada baixa;
- ✓ Todos os isolados do estudo apresentaram ao menos um dos genes de enterotoxinas pesquisados, dos quais *sei* e *seh* foram os mais frequentes;
- ✓ O *locus egc* apresentou uma baixa ocorrência, quando detectado pelo protocolo de RFLP-PCR; contudo, os genes componentes do *locus egc* foram detectados individualmente em grande parte dos isolados;
- ✓ A análise de PFGE revelou uma população bacteriana de elevada variabilidade genética;
- ✓ Os grupos *agr* predominantemente encontrados neste estudo foram *agrI* e *agrII*;
- ✓ O sequenciamento parcial do *locus agr* permitiu a observação de diversas mutações, que podem ser justificadas pela intensa manipulação dos isolados em atividades rotineiras de laboratório;
- ✓ Não foram observadas associações entre as características fenotípicas e genotípicas obtidas para os isolados deste estudo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abgrall, M., Misner, S. 1998. What is Food-Borne Illness? [Online]. Available at (Accessed: 30 de setembro).
- Adesiyun, A.A., Tatini, S.R., Hoover, D.G. 1984. Production of enterotoxin(s) by *Staphylococcus hyicus*. *Veterinary Microbiology* 9, 487-495.
- Ahmadi, M., Rohani, S.M.R., Ayremlou, N. 2010. Detection of *Staphylococcus aureus* in milk by PCR. *Comparative Clinical Pathology* 19, 91-94.
- Akineden, O., Annemuller, C., Hassan, A.A., Lammler, C., Wolter, W., Zschock, M. 2001. Toxin genes and other characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from milk of cows with mastitis. *Clin Diagn Lab Immunol* 8, 959-964.
- Al-Tarazi, Y.H., Albetar, M.A., Alaboudi, A.R. 2009. Biotyping and enterotoxigenicity of staphylococci isolated from fresh and frozen meat marketed in Jordan. *Food Research International* 42, 374-379.
- Alarcon, B., Vicedo, B., Aznar, R. 2006. PCR-based procedures for detection and quantification of *Staphylococcus aureus* and their application in food. *Journal of Applied Microbiology* 100, 352-364.
- Alborn, W.E., Hoskins, J., Unal, S., Flokowitsch, J.E., Hayes, C.A., Dotzlaf, J.E., Yeh, W.K., Skatrud, P.L. 1996. Cloning and characterization of *femA* and *femB* from *Staphylococcus epidermidis*. *Gene* 180, 177-181.
- Altboum, Z., Hertman, I., Sarid, S. 1985. Penicillinase plasmid-linked genetic determinants for enterotoxins B and C₁ production in *Staphylococcus aureus*. *Infection and Immunity* 47, 514-521.
- André, M.C.D.P.B., Campos, M.R.H., Borges, L.J., Kipnis, A., Pimenta, F.C., Serafini, Á.B. 2008. Comparison of *Staphylococcus aureus* isolates from food handlers, raw bovine milk and Minas Frescal cheese by antibiogram and pulsed-field gel electrophoresis following *SmaI* digestion. *Food Control* 19, 200-207.
- Annemuller, C., Lämmmler, C., Zschöck, M. 1999. Genotyping of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. *Veterinary Microbiology* 69, 217-224.
- Anonymous. 1997. Food-borne diseases - possibly 350 times more frequent than reported, Press Release WHO.
- Anonymous. 2001. Staphylococcal food poisoning in Japan. *Infectious Agents Surveillance Report* 22, 185-186.
- Anuniação, L.L.C., Linardi, V.R., Carmo, L.S., Bergdoll, M.S. 1994. Production of staphylococcal enterotoxin A in white cheese. *Revista de Microbiologia* 25, 68-71.
- Anuniação, L.L.C., Linardi, W.R., Do Carmo, L.S., Bergdoll, M.S. 1995. Production of staphylococcal enterotoxin A in cream-filled cake. *International Journal of Food Microbiology* 26, 259-263.

- AOAC. 1995. *Staphylococcus aureus* in foods: Surface plating method for isolation and enumeration. In: Cunniff, P.A., (Ed.), Official Methods of Analysis of AOAC International, 16 ed. AOAC International Gaithersburg, MD. 33-34.
- Arbuthnott, J.P., Coleman, D.C., Azavedo, J.S. 1990. Staphylococcal toxins in human disease. *Journal of Applied Microbiology* 19, 101-107.
- Arcuri, E.F., ângelo, F.F., Guimarães, M.F.M., Talon, R., Borges, M.F., Leroy, S., Loiseau, G., Lange, C.C., de Andrade, N.J., Montet, D. 2010. Toxigenic status of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine raw milk and Minas Frescal cheese in Brazil. *Journal of Food Protection* 73, 2225-2231.
- Argudin, M.A., Mendoza, M.C., Mendez, F.J., Martin, M.C., Guerra, B., Rodicio, M.R. 2009. Clonal complexes and diversity of exotoxin gene profiles in methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* isolates from patients in a Spanish hospital. *Journal of Clinical Microbiology* 47, 2097-2105.
- Argudin, M.A., Mendoza, M.C., Rodicio, M.R. 2010. Food Poisoning and *Staphylococcus aureus* Enterotoxins. *Toxins (Basel)* 2, 1751-1773.
- Arvidson, S., Tegmark, K. 2001. Regulation of virulence determinants in *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Medical Microbiology* 291, 159-170.
- Asao, T., Kumeda, Y., Kawai, T., Shibata, T., Oda, H., Haruki, K., Nakazawa, H., Kozaki, S. 2003. An extensive outbreak of staphylococcal food poisoning due to low-fat milk in Japan: estimation of enterotoxin A in the incriminated milk and powdered skim milk. *Epidemiology and Infection* 130, 33-40.
- Atanassova, V., Meindl, A., Ring, C. 2001. Prevalence of *Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxins in raw pork and uncooked smoked ham - a comparison of classical culturing detection and RFLP-PCR. *International Journal of Food Microbiology* 68, 105-113.
- Aydin, A., Sudagidan, M., Muratoglu, K. 2011. Prevalence of staphylococcal enterotoxins, toxin genes and genetic-relatedness of foodborne *Staphylococcus aureus* strains isolated in the Marmara Region of Turkey. *International Journal of Food Microbiology* 148, 99-106.
- Baba, T., Takeuchi, A., Kuroda, M., Yuzawa, H., Aoki, K.-i., Oguchi, A., Nagai, Y., Iwama, N., Asano, K., Naimi, T., Kuroda, H., Cui, L., Yamamoto, K., Hiramatsu, K. 2002. Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA. *The Lancet* 359, 1819-1827.
- Badini, K.B., Nader Filho, A., Amaral, L.A., Germano, P.M.L. 1996. Risco à saúde representado pelo consumo de leite cru comercializado clandestinamente. *Revista de Saúde Pública* 30, 549-552.
- Balaban, N., Rasooly, A. 2000. Staphylococcal enterotoxins. *International Journal of Food Microbiology* 61, 1 - 10.
- Bania, J., Dabrowska, A., Bystron, J., Korzekwa, K., Chrzanowska, J., Molenda, J. 2006. Distribution of newly described enterotoxin-like genes in *Staphylococcus aureus* from food. *International Journal of Food Microbiology* 108, 36-41.

- Barber, M.A. 1914. Milk poisoning due to a type of *Staphylococcus albus* occurring in the udder of a healthy cow. Philippine Journal of Science, Sector B (Tropical medicine) 9, 515-519.
- Bayles, K.W., Iandolo, J.J. 1989. Genetic and molecular analyses of the gene encoding Staphylococcal Enterotoxin D. Journal of Bacteriology 171, 4799-4806.
- Becker, K., Friedrich, A.W., Lubritz, G., Weilert, M., Peters, G., von Eiff, C. 2003. Prevalence of genes encoding pyrogenic toxin superantigens and exfoliative toxins among strains of *Staphylococcus aureus* isolated from blood and nasal specimens. Journal of Clinical Microbiology 41, 1434-1439.
- Becker, K., Friedrich, A.W., Peters, G., von Eiff, C. 2004. Systematic survey on the prevalence of genes coding for staphylococcal enterotoxins SEIM, SEIO, and SEIN. Mol Nutr Food Res 48, 488-495.
- Beenken, K.E., Dunman, P.M., McAleese, F., Macapagal, D., Murphy, E., Projan, S.J., Blevins, J.S., Smeltzer, M.S. 2004. Global gene expression in *Staphylococcus aureus* biofilms. Journal of Bacteriology 186, 4665-4684.
- Belay, N., Rasooly, A. 2002. *Staphylococcus aureus* growth and enterotoxin A production in an anaerobic environment. Journal of Food Protection 65, 199-204.
- Beloti, V., Müller, E.E., Freitas, J.C., Mettifogo, E. 1997. Estudo da mastite subclínica em rebanhos leiteiros no Norte do Paraná. Semina: Ciências Agrárias 18, 45-53.
- Ben Ayed, S., Boutiba-Ben Boubaker, I., Samir, E., Ben Redjeb, S. 2006. Prevalence of *agr* specificity groups among methicilin resistant *Staphylococcus aureus* circulating at Charles Nicolle hospital of Tunis. Pathologie Biologie 54, 435-438.
- Bergdoll, M.S., Sugiyama, H., Dack, G.M. 1959. Staphylococcal Enterotoxin. I. Purification. Archives of Biochemistry and Biophysics 85, 62-69.
- Bergdoll, M.S., Wong, A.C.L. 2006. Staphylococcal intoxications. In: Cliver, D., Potter, M., Riemann, H.P., (Eds.), Foodborne Infections and Intoxications, 3 ed. Academic Press. 523-556.
- Betley, M.J., Mekalanos, J.J. 1985. Staphylococcal enterotoxin A is encoded by phage. Science 229, 185-187.
- Blaiotta, G., Ercolini, D., Pennacchia, C., Fusco, V., Casaburi, A., Pepe, O., Villani, F. 2004. PCR detection of staphylococcal enterotoxin genes in *Staphylococcus* spp. strains isolated from meat and dairy products. Evidence for new variants of seG and sel in *S. aureus* AB-8802. Journal of Applied Microbiology 97, 719-730.
- Blaiotta, G., Fusco, V., von Eiff, C., Villani, F., Becker, K. 2006. Biotyping of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* by enterotoxin gene cluster (*egc*) polymorphism and *spa* typing analyses. Applied and Environmental Microbiology 72, 6117-6123.
- Boerema, J.A., Clemens, R., Brightwell, G. 2006. Evaluation of molecular methods to determine enterotoxigenic status and molecular genotype of bovine, ovine, human and food isolates of *Staphylococcus aureus*. International Journal of Food Microbiology 107, 192-201.

- Boles, B.R., Horswill, A.R. 2008. *agr*-mediated dispersal of *Staphylococcus aureus* biofilms. PLoS Pathogens 4, 1-13.
- Borst, D.W., Betley, M.J. 1994. Phage-associated differences in staphylococcal enterotoxin A gene (*sea*) expression correlate with *sea* allele class. Infection and Immunity 62, 113-118.
- Brakstad, O.G., Aasbakk, K., Maeland, J.A. 1992. Detection of *Staphylococcus aureus* by Polymerase Chain Reaction amplification of the *nuc* gene. Journal of Clinical Microbiology 30, 1654-1660.
- BRASIL. 2001. Resolução - RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001 Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial da Republica Federativa do Brasil, Brasil. 46-53.
- Breckinridge, J.C., Bergdoll, M.S. 1971. Outbreak of food-borne gastroenteritis due to a coagulase-negative enterotoxin-producing *Staphylococcus*. The New England Journal of Medicine 284, 541-543.
- Brizzio, A.A., Tedeschi, F.A., Zalazar, F.E. 2011. Descripción de un brote de intoxicación alimentaria estafilocócica ocurrido en Las Rosas, Provincia de Santa Fe, Argentina. Revista Argentina de Microbiología 43, 28-32.
- Busch, U., Nitschko, H. 1999. Methods for differentiation of microorganisms. Journal of Chromatography B 722, 263-278.
- Buzzola, F.R., Quelle, L., Gomez, M.I., Catalano, M., Steele-Moore, L., Berg, D., Gentilini, E., Denamiel, G., Sordelli, D.O. 2001. Genotypic analysis of *Staphylococcus aureus* from milk of dairy cows with mastitis in Argentina. Epidemiology and Infection 126, 445-452.
- Bystron, J., Podkowik, M., Piasecki, T., Wieliczko, A., Molenda, J., Bania, J. 2010. Genotypes and enterotoxin gene content of *S. aureus* isolates from poultry. Veterinary Microbiology 144, 498-501.
- Cafiso, V., Bertuccio, T., Santagati, M., Demelio, V., Spina, D., Nicoletti, G., Stefani, S. 2007. *agr*-genotyping and transcriptional analysis of biofilm-producing *Staphylococcus aureus*. FEMS Immunology & Medical Microbiology 51, 220-227.
- Carmo, L.S., Dias, R.S., Linardi, V.R., José de Sena, M., Aparecida dos Santos, D., Eduardo de Faria, M., Pena, E.C., Jett, M., Heneine, L.G. 2002. Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in Minas cheese and raw milk in Brazil. Food Microbiology 19, 9-14.
- Casman, E.P., Bennett, R.W., Dorsey, A.E., Stone, J.E. 1969. The micro-slide gel double diffusion test for the detection and assay of staphylococcal enterotoxins. Health Laboratory Science 6, 185-198.
- Cenci-Goga, B.T., Karama, M., Rossitto, P.V., Morgante, R.A., Cullor, J.S. 2003. Enterotoxin production by *Staphylococcus aureus* isolated from mastitic cows. Journal of Food Protection 66, 1693-1696.

- Cha, J.O., Lee, J.K., Jung, Y.H., Yoo, J.I., Park, Y.K., Kim, B.S., Lee, Y.S. 2006. Molecular analysis of *Staphylococcus aureus* isolates associated with staphylococcal food poisoning in South Korea. *Journal of Applied Microbiology* 101, 864-871.
- Charlier, C., Cretenet, M., Even, S., Le Loir, Y. 2009. Interactions between *Staphylococcus aureus* and lactic acid bacteria: An old story with new perspectives. *International Journal of Food Microbiology* 131, 30-39.
- Chen, T.R., Chiou, C.S., Tsen, H.Y. 2004. Use of novel PCR primers specific to the genes of staphylococcal enterotoxin G, H, I for the survey of *Staphylococcus aureus* strains isolated from food-poisoning cases and food samples in Taiwan. *International Journal of Food Microbiology* 92, 189-197.
- Cheung, A.L., Bayer, A.S., Zhang, G., Gresham, H., Xiong, Y.-Q. 2004. Regulation of virulence determinants *in vitro* and *in vivo* in *Staphylococcus aureus*. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 40, 1-9.
- Chiang, Y.-C., Liao, W.-W., Fan, C.-M., Pai, W.-Y., Chiou, C.-S., Tsen, H.-Y. 2008. PCR detection of staphylococcal enterotoxins (SEs) N, O, P, Q, R, U, and survey of SE types in *Staphylococcus aureus* isolates from food-poisoning cases in Taiwan. *International Journal of Food Microbiology* 121, 66-73.
- Chini, V., Dimitracopoulos, G., Spiliopoulou, I. 2006. Occurrence of the enterotoxin gene cluster and the toxic shock syndrome toxin 1 gene among clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* is related to clonal type and *agr* group. *Journal of Clinical Microbiology* 44, 1881-1883.
- Collery, M.M., Smyth, C.J. 2007. Rapid differentiation of *Staphylococcus aureus* isolates harbouring *egc* loci with pseudogenes *ent1* and *ent2* and the *selu* or *selu_v* gene using PCR-RFLP. *Journal of Medical Microbiology* 56, 208-216.
- Collery, M.M., Smyth, D.S., Tumilty, J.J.G., Twohig, J.M., Smyth, C.J. 2009. Associations between enterotoxin gene cluster types *egc1*, *egc2* and *egc3*, *agr* types, enterotoxin and enterotoxin-like gene profiles, and molecular typing characteristics of human nasal carriage and animal isolates of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Medical Microbiology* 58, 13-25.
- Corbella, X., Domínguez, M.A., Pujol, M., Ayats, J., Sendra, M., Pallares, R., Ariza, J., Gudiol, F. 1997. *Staphylococcus aureus* nasal carriage as a marker for subsequent staphylococcal infections in intensive care unit patients. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 16, 351-357.
- Coton, E., Desmonts, M.H., Leroy, S., Coton, M., Jamet, E., Christieans, S., Donnio, P.Y., Lebert, I., Talon, R. 2010. Biodiversity of coagulase-negative staphylococci in French cheeses, dry fermented sausages, processing environments and clinical samples. *International Journal of Food Microbiology* 137, 221-229.
- Couch, J.L., Soltis, M.T., Betley, M.J. 1988. Cloning and nucleotide sequence of the type E staphylococcal enterotoxin gene. *Journal of Bacteriology* 170, 2954-2960.
- Cretenet, M., Even, S., Le Loir, Y. 2011. Unveiling *Staphylococcus aureus* enterotoxin production in dairy products: a review of recent advances to face new challenges. *Dairy Science & Technology* 91, 127-150.

da Silva, N.J., Junqueira, V.C.A., Silveira, N.F.A., Taniwaki, M.H., dos Santos, R.F.S., Gomes, R.A.R. 2010. Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água. 4th ed. Editora Varela, Brasil.

de Boer, E., Beumer, R.R. 1999. Methodology for detection and typing of foodborne microorganisms. *International Journal of Food Microbiology* 50, 119-130.

De Buyser, M.-L., Dufour, B., Maire, M., Lafarge, V. 2001. Implication of milk and milk products in food-borne diseases in France and in different industrialised countries. *International Journal of Food Microbiology* 67, 1-17.

De Buyser, M., Audinet, N., Delbart, M.O., Maire, M., Françoise, F. 1998. Comparison of selective culture media to enumerate coagulase-positive staphylococci in cheeses made from raw milk. *Food Microbiology* 15, 339-346.

de Santana, E.H.W., Beloti, V., Aragon-Alegro, L.C., de Mendonça, M.B.O.C. 2010. Estafilococos em alimentos. *Arquivos do Instituto Biológico* 77, 545-554.

Delbes, C., Alomar, J., Chougui, N., Martin, J.F., Montel, M.C. 2006. *Staphylococcus aureus* growth and enterotoxin production during the manufacture of uncooked, semihard cheese from cows' raw milk. *Journal of Food Protection* 69, 2161-2167.

Delmas, G., da Silva, N.J., Pihier, N., Weill, F.-X., Vaillant, V., de Valk, H. 2010. Les toxi-infections alimentaires collectives en France entre 2006 et 2008. *Bulletin Épidémiologique Hebdomadaire* 31-32, 344-348.

Demchick, P.H., Palumbo, S.A., Smith, J.L. 1982. Influence of pH on freeze-thaw lethality in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Food Safety* 4, 185-189.

Derzelle, S., Dilasser, F., Duquenne, M., Deperrois, V. 2009. Differential temporal expression of the staphylococcal enterotoxins genes during cell growth. *Food Microbiology* 26, 896-904.

Devriese, L.A. 1984. A simplified system for biotyping *Staphylococcus aureus* strains isolated from different animal species. *Journal of Applied Microbiology* 56, 215-220.

Dias, R.S., Leal Bernardes, A.F., Zuccoli, P.C. 2011. A importância do processo de investigação na elucidação de surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA). *Periódico Científico do Núcleo de Biociências do Centro Universitário Izabela Hendrix* 1, 17-23.

Dinges, M.M., Orwin, P.M., Schlievert, P.M. 2000. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology Reviews* 13, 16 - 34.

Domenech, A., Hernandez, F.J., Orden, J.A., Goyache, J., Lopez, B., Suárez, G., Gómez-Lucía, E. 1992. Effect of six organic acids on staphylococcal growth and enterotoxin production. *Zeitschrift für Lebensmittel -Untersuchung und -Forschung* 194, 124-128.

dos Santos, L.L., Pedroso, T.F.F., Guirro, E. 2010. Perfil etiológico da mastite bovina na bacia leiteira de Santa Izabel do Oeste, Paraná. *Ciência Animal Brasileira* 11, 860-866.

Downes, F.P., Ito, K. 2001. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 4th ed. American Public Health Association, USA.

Dupuis, A., Hennekinne, J.A., Garin, J., Brun, V. 2008. Protein Standard Absolute Quantification (PSAQ) for improved investigation of staphylococcal food poisoning outbreaks. *Proteomics* 8, 4633-4636.

Elazhari, M., Elhabchi, D., Zerouali, K., Dersi, N., Elmalki, A., Hassar, M., Saile, R., Timinouni, M. 2011. Prevalence and distribution of superantigen toxin genes in clinical community isolates of *Staphylococcus Aureus*. *Journal of Bacteriology & Parasitology* 2, 1000107.

Enright, M.C. 2002. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99, 7687-7692.

Euzéby, J.P. 2012. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature [Online]. Available at <http://www.bacterio.cict.fr/> (Accessed: 20 de setembro).

Even, S., Charlier, C., Nouaille, S., Ben Zakour, N.L., Cretenet, M., Cousin, F.J., Gautier, M., Coccagn-Bousquet, M., Loubiere, P., Le Loir, Y. 2009. *Staphylococcus aureus* Virulence Expression Is Impaired by *Lactococcus lactis* in Mixed Cultures. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 4459-4472.

Evenson, M.L., Hinds, M.W., Bernstein, R.S., Bergdoll, M.S. 1988. Estimation of human dose of staphylococcal enterotoxin A from a large outbreak of staphylococcal food poisoning involving chocolate milk. *International Journal of Food Microbiology* 7, 311-316.

Fagundes, H., Barchesi, L., Nader Filho, A., Ferreira, L.M., Oliveira, C.A.F. 2010. Occurrence of *Staphylococcus aureus* in raw milk produced in dairy farms in São Paulo State, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology* 41, 376-380.

Faria, N.A., Carrico, J.A., Oliveira, D.C., Ramirez, M., de Lencastre, H. 2008. Analysis of typing methods for epidemiological surveillance of both methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strains. *Journal of Clinical Microbiology* 46, 136-144.

Feil, E.J., Cooper, J.E., Grundmann, H., Robinson, D.A., Enright, M.C., Berendt, T., Peacock, S.J., Smith, J.M., Murphy, M., Spratt, B.G., Moore, C.E., Day, N.P.J. 2003. How clonal is *Staphylococcus aureus*? *Journal of Bacteriology* 185, 3307-3316.

Fitzgerald, J.R., Monday, S.R., Foster, T.J., Bohach, G.A., Hartigan, P.J., Meaney, W.J., Smyth, C.J. 2001. Characterization of a putative pathogenicity island from bovine *Staphylococcus aureus* encoding multiple superantigens. *Journal of Bacteriology* 183, 63-70.

Frenay, H.M.E., Bunschoten, A.E., Schouls, L.M., Van Leeuwen, W., Vanderbroucke-Grals, C.M.J.E. 1996. Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on the basis of protein A gene polymorphisms. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 15, 60-64.

Freney, J., Kloos, W.E., Hajek, V., Webster, J.A., Bes, M., Brun, Y., Vernozy-Rozand, C. 1999. Recommended minimal standards for description of new staphylococcal species. *International Journal of Systematic Bacteriology* 49, 489-502.

Fueyo, J.M., Mendoza, M.C., Alvarez, M.A., Martin, M.C. 2005. Relationships between toxin gene content and genetic background in nasal carried isolates of *Staphylococcus aureus* from Asturias, Spain. *FEMS Microbiology Letters* 243, 447-454.

Fujikawa, H., Igarashi, H. 1988. Rapid latex agglutination test for detection of staphylococcal enterotoxins A to E that uses high-density latex particles. *Applied and Environmental Microbiology* 54, 2345-2348.

Fusco, V., Quero, G.M., Morea, M., Blaiotta, G., Visconti, A. 2011. Rapid and reliable identification of *Staphylococcus aureus* harbouring the enterotoxin gene cluster (*egc*) and quantitative detection in raw milk by real time PCR. *International Journal of Food Microbiology* 144, 528-537.

Gaskill, M.E., Khan, S.A. 1988. Regulation of the enterotoxin B gene in *Staphylococcus aureus*. *The Journal of Biological Chemistry* 263, 6276-6280.

Gillespie, B.E., Headrick, S.I., Boonyayatra, S., Oliver, S.P. 2009. Prevalence and persistence of coagulase-negative *Staphylococcus* species in three dairy research herds. *Vet Microbiol* 134, 65-72.

Gilot, P., Lina, G., Cochard, T., Poutrel, B. 2002. Analysis of the genetic variability of genes encoding the RNA III-activating components *agr* and TRAP in a population of *Staphylococcus aureus* strains isolated from cows with mastitis. *Journal of Clinical Microbiology* 40, 4060 - 4067.

Gómez-Lucía, E., Goyache, J., Orden, J.A., Domenech, A., Hernandez, F.J., Quiteria, J.A.R., Lopez, B., Blanco, J.L., Suárez, G. 1992. Growth of *Staphylococcus aureus* and synthesis of enterotoxin during ripening of experimental Manchego-type cheese. *Journal of Dairy Science* 75, 19-26.

Gormley, F.J., Little, C.L., Rawal, N., Gillespie, I.A., Lebaigue, S., Adak, G.K. 2011. A 17-year review of foodborne outbreaks: describing the continuing decline in England and Wales (1992-2008). *Epidemiology and Infection* 139, 688-699.

Gouloumès, C., Bes, M., Renaud, F., Lina, B., Reverdy, M.E., Brun, Y., Fleurette, J. 1996. Phenotypic and genotypic (pulsed-field gel electrophoresis characteristics of enterotoxin-A producing *Staphylococcus aureus* strains. *Research in Microbiology* 147, 263-271.

Grumann, D., Scharf, S.S., Holtfreter, S., Kohler, C., Steil, L., Engelmann, S., Hecker, M., Völker, U., Bröker, B.M. 2008. Immune cell activation by enterotoxin gene cluster (*egc*)-encoded and non-*egc* superantigens from *Staphylococcus aureus*. *Journal of Immunology* 181, 5054-5061.

Hallin, M., Deplano, A., Denis, O., De Mendonca, R., De Ryck, R., Struelens, M.J. 2007. Validation of pulsed-field gel electrophoresis and *spa* typing for long-term, nationwide epidemiological surveillance studies of *Staphylococcus aureus* infections. *Journal of Clinical Microbiology* 45, 127-133.

Halpin-Dohnalek, M.I., Marth, E.H. 1989. *Staphylococcus aureus*: Production of extracellular compounds and behavior in foods - A review. *Journal of Food Protection* 52, 267-282.

Harris, T.O., Grossman, D., Kappler, J.W., Marrack, P., Rich, R.R., Betley, M.J. 1993. Lack of complete correlation between emetic and T-cell stimulatory activities of staphylococcal enterotoxins. *Infection and Immunity* 61, 3175 - 3183.

Hennekinne, J.-A., De Buyser, M.-L., Dragacci, S. 2012. *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. *FEMS Microbiology Reviews* 36, 815-836.

Hennekinne, J.A., Brun, V., De Buyser, M.-L., Dupuis, A., Ostyn, A., Dragacci, S. 2009. Innovative application of mass spectrometry for the characterization of staphylococcal enterotoxins involved in food poisoning outbreaks. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 882-884.

Hennekinne, J.A., Ostyn, A., Guillier, F., Herbin, S., Pruger, A.L., Dragacci, S. 2010. How should staphylococcal food poisoning outbreaks be characterized? *Toxins (Basel)* 2, 2106-2116.

Hermans, K., Devriese, L.A., Haesebrouck, F. 2008. *Staphylococcus*. In: Gyles, C.L., Prescott, J.F., Songer, J.G., Thoen, C.O., (Eds.), *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals*, 3 ed. Blackwell Publishing Professional, USA. 43-57.

Hiramatsu, K., Asada, K., Suzuki, E., Okonogi, K., Yokota, T. 1992. Molecular cloning and nucleotide sequence determination of the regulator region of *mecA* gene in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *FEBS Letters* 298, 133-136.

Hirooka, E.Y., Müller, E.E., Freitas, J.C., Vicente, E., Yoshimoto, Y., Bergdoll, M.S. 1988. Enterotoxigenicity of *Staphylococcus intermedius* of canine origin. *International Journal of Food Microbiology* 7, 185-191.

Holden, M.T., Feil, E.J., Lindsay, J.A., Peacock, S.J., Day, N.P., Enright, M.C., Foster, T.J., Moore, C.E., Hurst, L., Atkin, R., Barron, A., Bason, N., Bentley, S.D., Chillingworth, C., Chillingworth, T., Churcher, C., Clark, L., Corton, C., Cronin, A., Doggett, J., Dowd, L., Feltwell, T., Hance, Z., Harris, B., Hauser, H., Holroyd, S., Jagels, K., James, K.D., Lennard, N., Line, A., Mayes, R., Moule, S., Mungall, K., Ormond, D., Quail, M.A., Rabinowitsch, E., Rutherford, K., Sanders, M., Sharp, S., Simmonds, M., Stevens, K., Whitehead, S., Barrell, B.G., Spratt, B.G., Parkhill, J. 2004. Complete genomes of two clinical *Staphylococcus aureus* strains: evidence for the rapid evolution of virulence and drug resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101, 9786-9791.

Hoover, D.G., Tatini, S.R., Maltais, J.B. 1983. Characterization of staphylococci. *Applied and Environmental Microbiology* 46, 649-660.

Hovde, C.J., Marr, J.C., Hoffmann, M.L., Hackett, S.P., Chi, Y.I., Crum, K.K., Stevens, D.L., Stauffacher, C.V., Bohach, G.A. 1994. Investigation of the role of the disulphide bond in the activity and structure of staphylococcal enterotoxin C1. *Molecular Microbiology* 13, 897 - 909.

- Hwang, S.Y., Kim, S.H., Jang, E.J., Kwon, N.H., Park, Y.K., Koo, H.C., Jung, W.K., Kim, J.M., Park, Y.H. 2007. Novel multiplex PCR for the detection of the *Staphylococcus aureus* superantigen and its application to raw meat isolates in Korea. *International Journal of Food Microbiology* 117, 99-105.
- Ibarra-Velázquez, L.M., Torres-Vitela, M.R., Andrade-González, I., López-Muraira, I.G., Valdés-Rodríguez, S.E., Gómez-Levy, J.F. 2011. Genetic variation and antibiotic susceptibility among *Staphylococcus aureus* isolates from dairy products and food handlers. *African Journal of Microbiology Research* 5, 4901-4908.
- Igarashi, H., Shingaki, M., Fujikawa, H., Ushioda, H., Terayama, T. 1985. Detection of staphylococcal enterotoxins in food poisoning outbreaks by reversed passive latex agglutination. *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene* 14, 255-257.
- Ikeda, T., Tamate, N., Yamaguchi, K., Makino, S. 2005. Mass outbreak of food poisoning disease caused by small amounts of staphylococcal enterotoxins A and H. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 2793-2795.
- ISO. 1999. ISO 6888-2 Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs - Horizontal Method for the Enumeration of Coagulase Positive Staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species): Part 1. Technique using Rabbit Plasma Fibrinogen agar medium. International Organisation of Standardisation, Geneva.
- Jarraud, S., Lyon, G.J., Figueiredo, A.M.S., Lina, G., Vandenesch, F., Etienne, J., Muir, T.W., Novick, R.P. 2000. Exfoliatin-producing strains define a fourth *agr* specificity group in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology* 182, 6517-6522.
- Jarraud, S., Mougel, C., Thioulouse, J., Lina, G., Meugnier, H., Forey, F., Nesme, X., Etienne, J., Vandenesch, F. 2002. Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, *agr* groups (alleles) and human disease. *Infection and Immunity* 70, 631-641.
- Jarraud, S., Peyrat, M.A., Lim, A., Tristan, A., Bes, M., Mougel, C., Etienne, J., Vandenesch, F., Bonneville, M., Lina, G. 2001. *egc*, a highly prevalent operon of enterotoxin gene, forms a putative nursery of superantigens in *Staphylococcus aureus*. *The Journal of Immunology* 166, 669 - 677.
- Ji, G., Beavis, R., Novick, R. 1997. Bacterial interference caused by autoinducing peptide variants. *Science* 276, 2027-2030.
- Johler, S., Stephan, R. 2010. Staphylococcal food poisoning: a current review. *Archiv für Lebensmittelhygiene* 61, 220 - 228.
- Johnson, H.M., Bukovic, J.A., Kauffman, P.E., Peeler, J.T. 1971. Staphylococcal enterotoxin B: solid-phase radioimmunoassay. *Applied Microbiology* 22, 837-841.
- Jorgensen, H.J., Mathisen, T., Lovseth, A., Omoe, K., Qvale, K.S., Loncarevic, S. 2005. An outbreak of staphylococcal food poisoning caused by enterotoxin H in mashed potato made with raw milk. *FEMS Microbiology Letters* 252, 267-272.
- Kérouanton, A., Hennekinne, J.A., Letertre, C., Petit, L., Chesneau, O., Brisabois, A., De Buyser, M.-L. 2007. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains associated

with food poisoning outbreaks in France. *International Journal of Food Microbiology* 115, 369-375.

Khambaty, F.M., Bennett, R.W., Shah, D.B. 1994. Application of pulsed-field gel electrophoresis to the epidemiological characterization of *Staphylococcus intermedius* implicated in a food-related outbreak. *Epidemiology and Infection* 113, 75-81.

Klotz, M., Opper, S., Heeg, K., Zimmermann, S. 2003. Detection of *Staphylococcus aureus* enterotoxins A to D by Real-Time Fluorescence PCR assay. *Journal of Clinical Microbiology* 41, 4683-4687.

Kobayashi, N., Wu, H., Kojima, K., Taniguchi, K., Urasawa, S., Uehara, N., Omizu, Y., Kishi, Y., Yagihashi, A., Kurokawa, I. 1994. Detection of *mecA*, *femA*, and *femB* genes in clinical strains of staphylococci using polymerase chain reaction. *Epidemiology and Infection* 113, 259-266.

Kokan, N.P., Bergdoll, M.S. 1987. Detection of low-enterotoxin-producing *Staphylococcus aureus* strains. *Applied and Environmental Microbiology* 53, 2675-2676.

Koneman, E.W. 2005. *Color Atlas & Textbook of Diagnostic Microbiology*. 6 ed. Lippincott Williams & Wilkins, USA.

Koreen, L., Ramaswamy, S.V., Graviss, E.A., Naidich, S., Musser, J.M., Kreiswirth, B.N. 2004. *spa* typing method for discriminating among *Staphylococcus aureus* isolates: implications for use of a single marker to detect genetic micro- and macrovariation. *Journal of Clinical Microbiology* 42, 792-799.

Kuroda, M., Ohta, T., Uchiyama, I., Baba, T., Yuzawa, H., Kobayashi, I., Cui, L., Oguchi, A., Aoki, K.-i., Nagai, Y., Lian, J., Ito, T., Kanamori, M., Matsumaru, H., Maruyama, A., Murakami, H., Hosoyama, A., Mizutani-Ui, Y., Takahashi, N.K., Sawano, T., Inoue, R.-i., Kaito, C., Sekimizu, K., Hirakawa, H., Kuhara, S., Goto, S., Yabuzaki, J., Kanehisa, M., Yamashita, A., Oshima, K., Furuya, K., Yoshino, C., Shiba, T., Hattori, M., Ogasawara, N., Hayashi, H., Hiramatsu, K. 2001. Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *The Lancet* 357, 1225-1240.

Lancette, G.A., Bennett, R.W. 2001. *Staphylococcus aureus*. In: Downes, F.C., Ito, K., (Eds.), *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*, 4 ed. American Public Health Press. 387-403.

Lange, C.C., Cardoso, M., Senczek, D., Schwarz, S. 1999. Molecular subtyping of *Staphylococcus aureus* isolates from cases of bovine mastitis in Brazil. *Veterinary Microbiology* 67, 127-141.

Langoni, H., Pinto, M.P., Domingues, P.F., Listoni, F.J.P. 1991. Etiologia e sensibilidade bacteriana da mastite bovina subclínica. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 43, 507-515.

Lawrynówicz-Paciorek, M., Kochman, M., Piekarska, K., Grochowska, A., Windyga, B. 2007. The distribution of enterotoxin and enterotoxin-like genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from nasal carriers and food samples. *International Journal of Food Microbiology* 117, 319-323.

Le Loir, Y., Baron, F., Gautier, M. 2003. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genetics and Molecular Research* 2, 63-76.

Lee, J.H., Lee, J.-H., Kim, M.S., Park, S.G. 2009. Analysis of foodborne disease outbreaks for improvement of food safety programs in Seoul, Republic of Korea, from 2002 to 2006. *Journal of Environmental Health* 71, 51-55.

Letertre, C., Perelle, S., Dilasser, F., Fach, P. 2003a. Detection and genotyping by real-time PCR of the staphylococcal enterotoxin genes *sea* to *sej*. *Molecular and Cellular Probes* 17, 139-147.

Letertre, C., Perelle, S., Dilasser, F., Fach, P. 2003b. Identification of a new putative enterotoxin SEU encoded by the *egc* cluster of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Applied Microbiology* 95, 38-43.

Lim, S.-K., Joo, Y.-S., Moon, J.-S., Lee, A.-R., Nam, H.-M., Wee, S.-H., Koh, H.-B. 2004. Molecular typing of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Korea. *The Journal of Veterinary Medicine & Science* 66, 581-584.

Lina, G., Bohach, G.A., Nair, S.P., Hiramatsu, K., Jouvin-Marche, E., Mariuzza, R. 2004. Standard nomenclature for the superantigens expressed by *Staphylococcus*. *The Journal of Infectious Diseases* 189, 2334 - 2336.

Lindsay, J.A., Holden, M.T. 2006. Understanding the rise of the superbug: investigation of the evolution and genomic variation of *Staphylococcus aureus*. *Funct Integr Genomics* 6, 186-201.

Lis, E., Podkowik, M., Bystron, J., Stefaniak, T., Bania, J. 2012. Temporal expression of staphylococcal enterotoxin H in comparison with accessory gene regulator-dependent and -independent enterotoxins. *Journal of Food Protection* 75, 238-244.

Lopes, C., Moreno, G., Curi, P.R., Gottschalk, A.F., Modolo, J.R., Horacio, A., Corrêa, A., Pavan, C. 1990. Characteristics of *Staphylococcus aureus* from subclinical bovine mastitis in Brazil. *The British Veterinary Journal* 146, 443-448.

López, C., Feltri, A., Leotta, G.A., González, G., Manfredi, E., Gottardi, G., Elder, M., de Las Carreras, S., Patri, C., Guajardo, F., San Martín, A., Rivas, M. 2008. Brote de enfermedad alimentaria en la localidad de El Huecú, provincia de Neuquén. *Revista Argentina de Microbiología* 40, 198-203.

Lucci, J.R., Barbieri, J.M., Bruhn, F.R.P., Daher, D.O., Janoele, F.C., Lopes, E., Rezende, H.K., Lara, L.J., Pereira, S.M., da Rocha, C.M.B.M. 2011. Caracterização do consumo do leite *in natura* em Lavras - Minas Gerais, 38o. Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária. Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária, Florianópolis-SC.

Malorny, B., Tassios, P.T., Rådström, P., Cook, N., Wagner, M., Hoorfar, J. 2003. Standardization of diagnostic PCR for the detection of foodborne pathogens. *International Journal of Food Microbiology* 83, 39-48.

Manders, S.M. 1998. Toxin-mediated streptococcal and staphylococcal disease. *Journal of the American Academy of Dermatology* 39, 383-398.

- Martins, R.P., Da Silva, J.A.G., Nakazato, L., Dutra, V., De Almeida Filho, E.S. 2010. Prevalência e etiologia infecciosa da mastite bovina na microrregião de Cuiabá-MT. *Ciência Animal Brasileira* 11, 181-187.
- Maslow, J.N., Slutsky, A.M., Arbeit, R.D. 1993. Applications of pulsed-field gel electrophoresis to molecular epidemiology. In: Persing, D.H., Smith, T.F., Tenover, F.C., White, T.J., (Eds.), *Diagnostic molecular microbiology: principles and applications*. American Society for Microbiology, Washington, D.C. 563-572.
- Matthews, K.R., Roberson, J., Gillespie, B.E., Luther, D.A., Oliver, S.P. 1997. Identification and differentiation of coagulase-negative *Staphylococcus aureus* by Polymerase Chain Reaction. *Journal of Food Protection* 60, 686-688.
- McLauchlin, J., Narayanan, G.L., Mithani, V., O'Neill, G. 2000. The detection of enterotoxins and Toxic Shock Syndrome toxin genes in *Staphylococcus aureus* by Polymerase Chain Reaction. *Journal of Food Protection* 63, 479-488.
- McNamara, P.J., Landolo, J.J. 1998. Genetic instability of the global regulator *agr* explains the phenotype of the *xpr* mutation in *Staphylococcus aureus* KSI9051. *Journal of Bacteriology* 180, 2609-2615.
- Mehrotra, M., Wang, G., Johnson, W.M. 2000. Multiplex PCR for detection of genes of *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, Toxic Shock Syndrome toxin 1, and methicilin resistance. *Journal of Clinical Microbiology* 38, 1032-1035.
- Melles, D.C., van Leeuwen, W.B., Snijders, S.V., Horst-Kreft, D., Peeters, J.K., Verbrugh, H.A., van Belkum, A. 2007. Comparison of multilocus sequence typing (MLST), pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), and amplified fragment length polymorphism (AFLP) for genetic typing of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Microbiological Methods* 69, 371-375.
- Mempel, M., Lina, G., Hojka, M., Schnopp, C., Seidl, H.P., Schafer, T., Ring, J., Vandenesch, F., Abeck, D. 2003. High prevalence of superantigens associated with the *egc* locus in *Staphylococcus aureus* isolates from patients with atopic eczema. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 22, 306-309.
- Menzies, R.E. 1977. Comparison of coagulase, deoxyribonuclease (DNase), and heat-stable nuclease tests for identification of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Pathology* 30, 606-608.
- Minor, T.E., Marth, E.H. 1970. Growth of *Staphylococcus aureus* in acidified pasteurized milk. *Journal of Milk and Food Technology* 33, 516-520.
- Mitchell, D.T., Levitt, D.G., Schlievert, P.M., Ohlendorf, D.H. 2000. Structural evidence for the evolution of pyrogenic toxin superantigens. *J Mol Evol* 51, 520-531.
- Monday, S.R., Bohach, G.A. 2001. Genes encoding staphylococcal enterotoxins G and I are linked and separated by DNA related to other staphylococcal enterotoxins. *Journal of Natural Toxins* 10, 1 - 8.
- Morandi, S., Brasca, M., Lodi, R., Cremonesi, P., Castiglioni, B. 2007. Detection of classical enterotoxins and identification of enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* from milk and dairy products. *Veterinary Microbiology* 124, 66-72.

Mota, R.A., De Medeiros, E.S., Dos Santos, M.V., Pinheiro Júnior, J.W., Moura, A.P.B.L., Coutinho, L.C.A. 2012. Participação de *Staphylococcus* spp na etiologia das mastites em bovinos leiteiros no Estado de Pernambuco (Brasil). *Ciência Animal Brasileira* 13, 124-130.

Munson, S.H., Tremaine, M.T., Betley, M.J., Welch, R.A. 1998. Identification and characterization of staphylococcal enterotoxin types G and I from *Staphylococcus aureus*. *Infection and Immunity* 66, 3337-3348.

Nájera-Sánchez, G., Maldonado-Rodríguez, R., Olvera, P.R., Garza, L.M. 2003. Development of two multiplex Polymerase Chain Reactions for the detection of enterotoxigenic strains of *Staphylococcus aureus* isolated from foods. *Journal of Food Protection* 66, 1055-1062.

Nashev, D., Toshkova, K., Bizeva, L., Akineden, Ö., Lämmler, C., Zschöck, M. 2007. Distribution of enterotoxin genes among carriage- and infection-associated isolates of *Staphylococcus aureus*. *Letters in Applied Microbiology* 45, 681-685.

Nema, V., Agrawal, R., Kamboj, D.V., Goel, A.K., Singh, L. 2007. Isolation and characterization of heat resistant enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* from a food poisoning outbreak in Indian subcontinent. *International Journal of Food Microbiology* 117, 29-35.

Nilsson, H., Björk, P., Dohlsten, M., Antonsson, P. 1999. Staphylococcal enterotoxin H displays unique MHC class II-binding properties. *The Journal of Immunology* 163, 6686-6693.

Normanno, G., Firinu, A., Virgilio, S., Mula, G., Dambrosio, A., Poggiu, A., Decastelli, L., Mioni, R., Scuota, S., Bolzoni, G. 2005. Coagulase-positive staphylococci and in food products marketed in Italy. *International Journal of Food Microbiology* 98, 73-79.

Notermans, S., Heuvelman, C.J. 1983. Combined effect of water activity, pH and sub-optimal temperature on growth and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Food Science* 48, 1832-1835.

Noto, M.J., Archer, G.L. 2006. A subset of *Staphylococcus aureus* strains harboring staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) type IV is deficient in CcrAB-mediated SCC*mec* excision. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50, 2782-2788.

Novick, R. 2003a. Mobile genetic elements and bacterial toxins: the superantigen-encoding pathogenicity islands of *Staphylococcus aureus*. *Plasmid* 49, 93-105.

Novick, R.P. 2003b. Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. *Molecular Microbiology* 48, 1429-1449.

Oh, S.-W., Lee, N., Cho, Y.S., Shin, D.-B., Choi, S.Y., Koo, M. 2007. Occurrence of toxigenic *Staphylococcus aureus* in ready-to-eat food in Korea. *Journal of Food Protection* 70, 1153-1158.

Oh, S.K., Koo, M., Lee, N., Kim, H.J., Oh, S.-W., Choi, S.Y. 2011. Distribution of newly described enterotoxin-like genes in *Staphylococcus aureus* isolated from ready-to-eat foods in Korea. *Food Science and Biotechnology* 20, 579-584.

- Okoji, C.N., Inglis, B., Stewart, P.R. 1993. Potential problems in the use of oligonucleotide probes for staphylococcal enterotoxin genes. *Journal of Applied Microbiology* 74, 637-644.
- Omoe, K., Hu, D.L., Takahashi-Omoe, H., Nakane, A., Shinagawa, K. 2003. Identification and characterization of a new staphylococcal enterotoxin-related putative toxin encoded by two kinds of plasmids. *Infection and Immunity* 71, 6088-6094.
- Omoe, K., Imanishi, K., Hu, D.L., Kato, H., Fugane, Y., Abe, Y., Hamaoka, S., Watanabe, Y., Nakane, A., Uchiyama, T., Shinagawa, K. 2005. Characterization of novel staphylococcal enterotoxin-like toxin type P. *Infection and Immunity* 73, 5540-5546.
- Omoe, K., Ishikawa, M., Shimoda, Y., Hu, D.L., Ueda, S., Shinagawa, K. 2002. Detection of *seg*, *seh*, and *sei* genes in *Staphylococcus aureus* isolates and determination of the enterotoxin productivities of *S. aureus* isolates harboring *seg*, *seh*, or *sei* genes. *Journal of Clinical Microbiology* 40, 857-862.
- Ono, H.K., Omoe, K., Imanishi, K., Iwakabe, Y., Hu, D.L., Kato, H., Saito, N., Nakane, A., Uchiyama, T., Shinagawa, K. 2008. Identification and characterization of two novel staphylococcal enterotoxins, types S and T. *Infection and Immunity* 76, 4999-5005.
- Ortolani, M.B.T., Yamazi, A.K., Moraes, P.M., Viçosa, G.N., Nero, L.A. 2010. Microbiological quality and safety of raw milk and soft cheese and detection of autochthonous lactic acid bacteria with antagonistic activity against *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., and *Staphylococcus aureus*. *Foodborne Pathogens and Disease* 7, 175-180.
- Orwin, P.M., Leung, D.Y., Donahue, H.L., Novick, R.P., Schlievert, P.M. 2001. Biochemical and biological properties of staphylococcal enterotoxin K. *Infection and Immunity* 69, 360-366.
- Ostyn, A., De Buyser, M.-L., Guillier, F., Groult, J., Félix, B., Salah, S., Delmas, G., Hennekinne, J.A. 2010. First evidence of a food poisoning outbreak due to staphylococcal enterotoxin type E, France, 2009. *Eurosurveillance* 15, 1-4.
- Otto, M. 2001. *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* peptide pheromones produced by the accessory gene regulator (*agr*) system. *Peptides* 22, 1603-1608.
- Pané-Farré, J., Jonas, B., Förstner, K., Engelmann, S., Hecker, M. 2006. The σ^B regulon in *Staphylococcus aureus* and its regulation. *International Journal of Medical Microbiology* 296, 237-258.
- Papakyriacou, H., Vaz, D., Simor, A., Louie, M., McGavin, M.J. 2000. Molecular analysis of the accessory gene regulator (*agr*) locus and balance of virulence factor expression in epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *The Journal of Infectious Diseases* 181, 990-1000.
- Park, C.E., de Melo Serrano, A., Landgraf, M., Huang, J.C., Stankiewicz, Z., Rayman, M.K. 1980. A survey of microorganisms for thermonuclease production. *Canadian Journal of Microbiology* 26, 532-538.

Park, C.E., El Derea, H.B., Rayman, M.K. 1978. Evaluation of staphylococcal thermonuclease (TNase) assay as a means of screening foods for growth of staphylococci and possible enterotoxin production. *Canadian Journal of Microbiology* 24, 1135-1139.

Park, C.E., Warburton, D., Laffey, P.J., Akhtar, M., Catherwood, K., Crawford, C., Durzi, S., Foster, R., Fox, C., Gour, L., Jessett, K., Langridge, M., Mann, E., Fawcett, J., Morrow, A., Oggel, J., Peticlerc, L., Purvis, U., Zandstra, W. 1996. A collaborative study on the detection of staphylococcal enterotoxins in foods with an enzyme immunoassay kit (TECRA). *Journal of Food Protection* 59, 390-397.

Peerayeh, S.N., Azimian, A., Nejad, Q.B., Kashi, M. 2009. Prevalence of *agr* specificity groups among *Staphylococcus aureus* isolates from University Hospitals in Tehran. *Laboratory Medicine* 40, 27-29.

Peles, F., Wagner, M., Varga, L., Hein, I., Rieck, P., Gutser, K., Keresztúri, P., Kardos, G., Turcsányi, I., Béri, B., Szabó, A. 2007. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine milk in Hungary. *International Journal of Food Microbiology* 118, 186-193.

Pereira, M.L., Do Carmo, L.S., dos Santos, E.J., Pereira, J.L., Bergdoll, M.S. 1996. Enterotoxin H in staphylococcal food poisoning. *Journal of Food Protection* 59, 559-561.

Pettersson, H., Forsberg, G. 2002. Staphylococcal enterotoxin H contrasts closely related enterotoxins in species reactivity. *Immunology* 106, 71-79.

Pilipčincová, I., Bhide, M., Dudriková, E., Trávníček, M. 2010. Genotypic characterization of coagulase-negative staphylococci isolated from sheep milk in Slovakia. *Acta Veterinaria Brno* 79, 269-275.

Pinto, B., Chenoll, E., Aznar, R. 2005. Identification and typing of food-borne *Staphylococcus aureus* by PCR-based techniques. *Systematic and Applied Microbiology* 28, 340-352.

Pocsfalvi, G., Cacace, G., Cuccurullo, M., Serluca, G., Sorrentino, A., Schlosser, G., Blaiotta, G., Malorni, A. 2008. Proteomic analysis of exoproteins expressed by enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* strains. *Proteomics* 8, 2462-2476.

Prévost, G., Jaulhac, B., Piemont, Y. 1992. DNA Fingerprinting by pulsed-field gel electrophoresis is more effective than ribotyping in distinguishing among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates. *Journal of Clinical Microbiology* 30, 967-973.

Ren, K., Bannan, J.D., Pancholi, V., Cheung, A.L., Robbins, J.C., Fischetti, V.A., Zabriskie, J.B. 1994. Characterization and biological properties of a new staphylococcal exotoxin. *The Journal of Experimental Medicine* 180, 1675-1683.

Robern, H., Dighton, M., Yano, Y., Dickie, N. 1975. Double-antibody radioimmunoassay for staphylococcal enterotoxin C₂. *Applied Microbiology* 30, 525-529.

- Roberson, J.R., Fox, L.K., Hancock, D.D., Besser, T.E. 1992. Evaluation of methods for differentiation of coagulase-positive staphylococci. *Journal of Clinical Microbiology* 30, 3217-3129.
- Rosec, J.P., Gigaud, O. 2002. Staphylococcal enterotoxin genes of classical and new types detected by PCR in France. *International Journal of Food Microbiology* 77, 61-70.
- Rosec, J.P., Guiraud, J.P., Dalet, C., Richard, N. 1997. Enterotoxin production by staphylococci isolated from foods in France. *International Journal of Food Microbiology* 35, 213-221.
- Ruzickova, V., Karpiskova, R., Pantucek, R., Pospisilova, M., Cernikova, P., Doskar, J. 2008. Genotype analysis of enterotoxin H-positive *Staphylococcus aureus* strains isolated from food samples in the Czech Republic. *International Journal of Food Microbiology* 121, 60-65.
- Sabioni, J.G., Hirooka, E.Y., de Souza, M.L. 1988. Intoxicação alimentar por queijo Minas contaminado com *Staphylococcus aureus* *Revista de Saúde Pública* 22, 458-461.
- Sakai, F., Ihara, H., Aoyama, K., Igarashi, H., Yanahira, S., Ohkubo, T., Asao, T., Kozaki, S. 2008. Characteristics of enterotoxin H-producing *Staphylococcus aureus* isolated from clinical cases and properties of the enterotoxin productivity. *Journal of Food Protection* 71, 1855-1860.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 74, 5463-5467.
- Sankaran, R., Leela, R.K. 1982. Comparison of coagulase and thermonuclease activities with enterotoxin production by staphylococci from foods. *Food / Nahrung* 26, 549-553.
- Saulnier, P., Bourneix, C., Prévost, G., Andremont, A. 1993. Random Amplified Polymorphic DNA assay is less discriminant than pulsed-field gel electrophoresis for typing strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology* 31, 982-985.
- Saunders, G.C., Bartlett, M.L. 1977. Double-antibody solid-phase enzyme immunoassay for the detection of staphylococcal enterotoxin A. *Applied and Environmental Microbiology* 34, 518-522.
- Scallan, E., Hoekstra, R.M., Angulo, F.J., Tauxe, R.V., Widdowson, M.-A., Roy, S.L., Jones, J.L., Griffin, P.M. 2011. Foodborne illness acquired in the United States - Major Pathogens. *Emerging Infectious Diseases* 17, 7-15.
- Schad, E.M., Papageorgiou, A.C., Svensson, L.A., Acharya, K.R. 1997. A structural and functional comparison of staphylococcal enterotoxins A and C₂ reveals remarkable similarity and dissimilarity. *Journal of Molecular Biology* 269, 270-280.
- Schelin, J., Wallin-Carlquist, N., Thorup Cohn, M., Lindqvist, R., Barker, G.C. 2011. The formation of *Staphylococcus aureus* enterotoxin in food environments and advances in risk assessment. *Virulence* 2, 580-592.

- Scherrer, D., Corti, S., Muehlherr, J.E., Zweifel, C., Stephan, R. 2004. Phenotypic and genotypic characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from raw bulk-tank milk samples of goats and sheep. *Veterinary Microbiology* 101, 101-107.
- Schlosser, G., Kacer, P., Kuzma, M., Szilagyi, Z., Sorrentino, A., Manzo, C., Pizzano, R., Malorni, L., Pocsfalvi, G. 2007. Coupling immunomagnetic separation on magnetic beads with matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for detection of staphylococcal enterotoxin B. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 6945-6952.
- Schmid, D., Fretz, R., Winter, P., Mann, M., Hoger, G., Stoger, A., Ruppitsch, W., Ladstätter, J., Mayer, N., de Martin, A., Allerberger, F. 2009. Outbreak of staphylococcal food intoxication after consumption of pasteurized milk products, June 2007, Austria. *Wien Klin Wochenschr* 121, 125-131.
- Schoeller, N., Ingham, S.C. 2001. Comparison of the Baird–Parker agar and 3M™ Petrifilm™ rapid *S. aureus* count plate methods for detection and enumeration of *Staphylococcus aureus*. *Food Microbiology* 18, 581-587.
- Seo, K.S., Bohach, G.A. 2007. *Staphylococcus aureus*. In: Doyle, M.P., Beuchat, L.R., (Eds.), *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*, 3 ed. American Society for Microbiology Press, Washington, D.C. 493-518.
- Sergelidis, D., Abraham, A., Anagnostou, V., Govaris, A., Papadopoulos, T., Papa, A. 2012. Prevalence, distribution, and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* in ready-to-eat salads and in the environment of a salad manufacturing plant in Northern Greece. *Czech Journal of Food Sciences* 30, 285-291.
- Shafer, W.M., Iandolo, J.J. 1977. Chromosomal locus for staphylococcal enterotoxin B. *Infection and Immunity* 20, 273-278.
- Shalita, Z., Hertman, I., Sarid, S. 1977. Isolation and characterization of a plasmid involved with enterotoxin B production in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology* 129, 317-325.
- Sharma, N.K., Rees, C.E.D., Dodd, C.E. 2000. Development of a single-reaction multiplex PCR toxin typing assay for *Staphylococcus aureus* strains. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 1347-1353.
- Sheehan, D.G., Jervis, H.R., Takeuchi, A., Sprinz, H. 1970. The effect of staphylococcal enterotoxin on the epithelial mucosubstance of the small intestine of rhesus monkeys. *The American Journal of Pathology* 60, 1 - 18.
- Shopsin, B., Gomez, M.I., Montgomery, S.O., Smith, D.H., Waddington, M., Dodge, D.E., Bost, D.A., Riehman, M., Naidich, S., Kreiswirth, B.N. 1999. Evaluation of Protein A gene polymorphic region DNA sequencing for typing of *Staphylococcus aureus* strains. *Journal of Clinical Microbiology* 37, 3556-3563.
- Shopsin, B., Mathema, B., Alcabes, P., Said-Salim, B., Lina, G., Matsuka, A., Martinez, J., Kreiswirth, B.N. 2003. Prevalence of *agr* specificity groups among *Staphylococcus aureus* strains colonizing children and their guardians. *Journal of Clinical Microbiology* 41, 456-459.

- Shylaja, R., Murali, H.S., Batra, H.V., Bawa, A.S. 2010. A novel multiplex PCR system for the detection of staphylococcal enterotoxin B, TSST, *nuc* and *femA* genes of *Staphylococcus aureus* in food system. *Journal of Food Safety* 30, 443-454.
- Silva, L.H.C., Monteiro, A.A., Beloti, V., Barros, M.A.F., Nero, L.A., De Santana, E.H.W., de Moraes, L.B. 2005. Utilização de plasma de cavalo no teste de coagulase em estafilococos isolados de leite cru. *Semina: Ciências Agrárias* 26, 381-386.
- Smith, E.M., Green, L.E., Medley, G.F., Bird, H.E., Fox, L.K., Schukken, Y.H., Kruze, J.V., Bradley, A.J., Zadoks, R.N., Dowson, C.G. 2005. Multilocus sequence typing of intercontinental bovine *Staphylococcus aureus* isolates. *Journal of Clinical Microbiology* 43, 4737-4743.
- Smyth, D.S., Hartigan, P.J., Meaney, W.J., Fitzgerald, J.R., Deobald, C.F., Bohach, G.A., Smyth, C.J. 2005. Superantigen genes encoded by the *egc cluster* and SaPI_{bov} are predominant among *Staphylococcus aureus* isolates from cows, goats, sheep, rabbits and poultry. *Journal of Medical Microbiology* 54, 401-411.
- Somerville, G.A., Beres, S.B., Fitzgerald, J.R., DeLeo, F.R., Cole, R.L., Hoff, J.S., Musser, J.M. 2002. *In vitro* serial passage of *Staphylococcus aureus*: changes in physiology, virulence factor production, and *agr* nucleotide sequence. *Journal of Bacteriology* 184, 1430-1437.
- Sommerhäuser, J., Kloppert, B., Wolter, W., Zschöck, M., Sobiraj, A., Failing, K. 2003. The epidemiology of *Staphylococcus aureus* infections from subclinical mastitis in dairy cows during a control programme. *Veterinary Microbiology* 96, 91-102.
- Srinivasan, V., Sawant, A.A., Gillespie, B.E., Headrick, S.J., Ceasaris, L., Oliver, S.P. 2006. Prevalence of enterotoxin and Toxic Shock Syndrome toxin genes in *Staphylococcus aureus* isolated from milk of cows with mastitis. *Foodborne Pathogens and Disease* 3, 274-283.
- Straub, J.A., Hertel, C., Hammes, W.P. 1999. A 23S rDNA-targeted Polymerase Chain Reaction-based system for detection of *Staphylococcus aureus* in meat starter cultures and dairy products. *Journal of Food Protection* 62, 1150-1156.
- Struelens, M.J., Deplano, A., Godard, C., Maes, N., Serruys, E. 1992. Epidemiologic typing and delineation of genetic relatedness of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by macrorestriction analysis of genomic DNA by using pulsed-field gel electrophoresis. *Journal of Clinical Microbiology* 30, 2599-2605.
- Su, Y.-C., Wong, A.C.L. 1995. Identification and purification of a new staphylococcal enterotoxin, H. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 1438-1443.
- Su, Y.-C., Wong, A.C.L. 1996. Detection of staphylococcal enterotoxin H by an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Journal of Food Protection* 59, 327-330.
- Sugiyama, H., Bergdoll, M.S., Dack, G.M. 1962. Early development of a temporary resistance to the emetic action of staphylococcal enterotoxin. *The Journal of Infectious Diseases* 111, 233-238.

- Surgalla, M.J., Bergdoll, M.S., Dack, G.M. 1953. Some observations on the assay of staphylococcal enterotoxin by the monkey-feeding test. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 41, 782-788.
- Tamarapu, S., McKillip, J.L., Drake, M. 2001. Development of a multiplex polymerase chain reaction assay for detection and differentiation of *Staphylococcus aureus* in dairy products. *Journal of Food Protection* 64, 664-668.
- Tang, J., Tang, C., Chen, J., Du, Y., Yang, X.-n., Wang, C., Zhang, H., Yue, H. 2011. Phenotypic characterization and prevalence of enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* isolates from outbreaks of illness in Chengdu City. *Foodborne Pathogens and Disease* 8, 1317-1320.
- Thoendel, M., Kavanaugh, J.S., Flack, C.E., Horswill, A.R. 2011. Peptide signaling in the staphylococci. *Chemical Reviews* 111, 117 - 151.
- Thomas, D., Chou, S., Dauwalder, O., Lina, G. 2007. Diversity in *Staphylococcus aureus* enterotoxins. *Chemical Immunology and Allergy* 93, 24 - 41.
- Thomas, D.Y., Jarraud, S., Lemercier, B., Cozon, G., Echasserieau, K., Etienne, J., Gougeon, M.L., Lina, G., Vandenesch, F. 2006. Staphylococcal enterotoxin-like toxins U2 and V, two new staphylococcal superantigens arising from recombination within the *enterotoxin gene cluster*. *Infection and Immunity* 74, 4724-4734.
- Thorberg, B.M., Kuhn, I., Aarestrup, F.M., Brandstrom, B., Jonsson, P., Danielsson-Tham, M.L. 2006. Pheno- and genotyping of *Staphylococcus epidermidis* isolated from bovine milk and human skin. *Veterinary Microbiology* 115, 163-172.
- Tondo, E.C., Guimarães, M.C., Henriques, J.A., Ayub, M.A. 2000. Assessing and analysing contamination of a dairy products processing plant by *Staphylococcus aureus* using antibiotic resistance and PFGE. *Canadian Journal of Microbiology* 46, 1108-1114.
- Traber, K.E., Lee, E., Benson, S., Corrigan, R., Cantera, M., Shopsis, B., Novick, R.P. 2008. *agr* function in clinical *Staphylococcus aureus* isolates. *Microbiology* 154, 2265-2274.
- Tremaine, M.T., Brockman, D.K., Betley, M.J. 1993. Staphylococcal enterotoxin A gene (*sea*) expression is not affected by the accessory gene regulator (*agr*). *Infection and Immunity* 61, 356-359.
- Tsen, H.Y., Yu, G.K., Wang, K.C., Wang, S.J., Chang, M.Y., Lin, L.Y. 1998. Comparison of the enterotoxigenic types, toxic shock syndrome toxin I (TSST-1) strains and antibiotic susceptibilities for enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* strains isolated from food and clinical samples. *Food Microbiology* 15, 33-41.
- Tseng, C.W., Zhang, S., Stewart, G.C. 2004. Accessory gene regulator control of staphylococcal enterotoxin D gene expression. *Journal of Bacteriology* 186, 1793-1801.
- Udo, E.E., Al-Bustan, M.A., Jacob, L.E., Chugh, T.D. 1999. Enterotoxin production by coagulase-negative staphylococci in restaurant workers from Kuwait City may be a potential cause of food poisoning. *Journal of Medical Microbiology* 48, 819-823.

- van Leeuwen, W., van Nieuwenhuizen, W., Gijzen, C., Verbrugh, H., van Belkum, A. 2000. Population studies of methicillin-resistant and -sensitive *Staphylococcus aureus* strains reveal a lack of variability in the *agrD* gene, encoding a Staphylococcal Autoinducer Peptide. *Journal of Bacteriology* 182, 5721-5729.
- Vandenesch, F., Célard, M., Arpin, D., Bes, M., Greenland, T., Etienne, J. 1995. Catheter-related bacteremia associated with coagulase-positive *Staphylococcus intermedius*. *Journal of Clinical Microbiology* 33, 2508-2510.
- Vannuffel, P., Gigi, J., Ezzedine, H., Vandercam, B., Delmee, M., Wauters, G., Gala, J.L. 1995. Specific detection of methicillin-resistant *Staphylococcus* species by multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 33, 2864-2867.
- Vannuffel, P., Heusterspreute, M., Bouyer, M., Vandercam, B., Philippe, M., Gala, J.L. 1999. Molecular characterization of *femA* from *Staphylococcus hominis* and *Staphylococcus saprophyticus*, and *femA*-based discrimination of staphylococcal species. *Research in Microbiology* 150, 129-141.
- Varnan, A.H., Evans, M.G. 1996. *Foodborne Pathogens: An Illustrated Text* Manson Publishing, England.
- Vautor, E., Carsenti-Dellamonica, H., Sabah, M., Mancini, G., Pépin, M., Dellamonica, P. 2007. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates recovered from dairy sheep farms (*agr* group, adherence, slime, resistance to antibiotics). *Small Ruminant Research* 72, 197-199.
- Vemula, S.R., Kumar, R.N., Polasa, K. 2012. Foodborne diseases in India – a review. *British Food Journal* 114, 661-680.
- Veras, J.F., do Carmo, L.S., Tong, L.C., Shupp, J.W., Cummings, C., dos Santos, D.A., Cerqueira, M.M.O.P., Cantini, A., Nicoli, J.R., Jett, M. 2008. A study of the enterotoxigenicity of coagulase-negative and coagulase-positive staphylococcal isolates from food poisoning outbreaks in Minas Gerais, Brazil. *International Journal of Infectious Diseases* 12, 410-415.
- Vernozy-Rozand, C., Mazuy, C., Prevost, G., Lapeyre, C., Bes, M., Brun, Y., Fleurette, J. 1996. Enterotoxin production by coagulase-negative staphylococci isolated from goats' milk and cheese. *International Journal of Food Microbiology* 30, 271-280.
- Viçosa, G.N., Moraes, P.M., Yamazi, A.K., Nero, L.A. 2010. Enumeration of coagulase and thermonuclease-positive *Staphylococcus* spp. in raw milk and fresh soft cheese: an evaluation of Baird-Parker agar, Rabbit Plasma Fibrinogen agar and the Petrifilm Staph Express count system. *Food Microbiology* 27, 447-452.
- Victor, R., Lachica, R.V., Weiss, K.F., Deibel, R.H. 1969. Relationships among coagulase, enterotoxin, and heat-stable deoxyribonuclease production by *Staphylococcus aureus*. *Applied Microbiology* 18, 126-127.
- Wallin-Carlquist, N., Márta, D., Borch, E., Rådström, P. 2010. Prolonged expression and production of *Staphylococcus aureus* enterotoxin A in processed pork meat. *International Journal of Food Microbiology* 141, S69-S74.

- Wattinger, L., Stephan, R., Layer, F., Johler, S. 2012. Comparison of *Staphylococcus aureus* isolates associated with food intoxication with isolates from human nasal carriers and human infections. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 31, 455-464.
- Weiler, N., Leotta, G.A., Zarate, M.N., Manfredi, E., Alvarez, M.E., Rivas, M. 2011. Brote de intoxicación alimentaria asociado al consumo de leche ultrapasteurizada en la República del Paraguay. *Revista Argentina de Microbiología* 43, 33-36.
- Wieneke, A.A. 1991. Comparison of four kits for the detection of staphylococcal enterotoxin in foods from outbreaks of food poisoning. *International Journal of Food Microbiology* 14, 305-312.
- Wieneke, A.A., Roberts, D., Gilbert, R.J. 1993. Staphylococcal food poisoning in the United Kingdom, 1969-90. *Epidemiology and Infection* 110, 519-531.
- Wilson, I.G., Cooper, J.E., Gilmour, A. 1991. 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*. *Applied and Environmental Microbiology* 57, 1793-1798.
- Wright, J.D., Holland, K.T. 2003. The effect of cell density and specific growth rate on accessory gene regulator and toxic shock syndrome toxin-1 gene expression in *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiology Letters* 218, 377-383.
- Xie, Y., He, Y., Gehring, A., Hu, Y., Li, Q., Tu, S.I., Shi, X. 2011. Genotypes and toxin gene profiles of *Staphylococcus aureus* clinical isolates from China. *PLoS One* 6, e28276.
- Yan, X., Wang, B., Tao, X., Hu, Q., Cui, Z., Zhang, J., Lin, Y., You, Y., Shi, X., Grundmann, H. 2012. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains associated with food poisoning in Shenzhen, China. *Applied and Environmental Microbiology* 78, 6637-6642.
- Yang, Y., Su, X.-d., Yuan, Y.-w., Kang, C.-y., Li, Y.-j., Zhang, w., Zhong, X.-y. 2007. Detection of *Staphylococcus aureus* in dairy products by Polymerase Chain Reaction assay. *Agricultural Sciences in China* 6, 857-862.
- Yoon, H.J., Choi, Y.J., Lee, K., Yong, D., Kim, J.M., Song, Y.G. 2007. Accessory gene regulator group polymorphisms in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an association with clinical significance. *Yonsei Medical Journal* 48, 176-183.
- Zadoks, R., Leeuwen, W., Barkema, H.W., Sampimon, O.C., Verbrugh, H., Schukken, Y.H., Belkum, A. 2000. Application of pulsed-field gel electrophoresis and binary typing as tools in veterinary clinical microbiology and molecular epidemiologic analysis of bovine and human *Staphylococcus aureus* isolates. *Journal of Clinical Microbiology* 38, 1931-1939.
- Zadoks, R.N., van Leeuwen, W.B., Kreft, D., Fox, L.K., Barkema, H.W., Schukken, Y.H., van Belkum, A. 2002. Comparison of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine and human skin, milking equipment, and bovine milk by Phage Typing, Pulsed-

Field Gel Electrophoresis, and Binary Typing. *Journal of Clinical Microbiology* 40, 3894-3902.

Zell, C., Resch, M., Rosenstein, R., Albrecht, T., Hertel, C., Götz, F. 2008. Characterization of toxin production of coagulase-negative staphylococci isolated from food and starter cultures. *International Journal of Food Microbiology* 127, 246-251.

Zhang, C., Shen, Y., Dong, M. 2013. Distribution, polymorphism and temporal expression of *egc* in *Staphylococcus aureus* isolates from various foods in China. *Food Control* 29, 279-285.

Zhang, C., Zhang, D., Yang, J., Zhou, J., Hu, Q., Ling, R., Dong, M. 2012. Comparative evaluation of the association among enumeration methods and production of enterotoxins in food-derived *Staphylococcus aureus*. *Journal of AOAC International* 95, 105-110.

Zhang, S., Iandolo, J.J., Stewart, G.C. 1998. The enterotoxin D plasmid of *Staphylococcus aureus* encodes a second enterotoxin determinant (*sej*). *FEMS Microbiology Letters* 168, 227 - 233.

Ziebandt, A.K., Kusch, H., Degner, M., Jaglitz, S., Sibbald, M.J., Arends, J.P., Chlebowicz, M.A., Albrecht, D., Pantucek, R., Doskar, J., Ziebuhr, W., Broker, B.M., Hecker, M., van Dijk, J.M., Engelmann, S. 2010. Proteomics uncovers extreme heterogeneity in the *Staphylococcus aureus* exoproteome due to genomic plasticity and variant gene regulation. *Proteomics* 10, 1634-1644.

Zocche, F., Bastos, C.P., da Silva, W.P. 2010. Detecção de genes do *cluster egc* em *Staphylococcus aureus* isolados de alimentos de origem animal. *Ciência Rural* 40, 1134-1140.

Zygmunt, W.A., Browder, H.P., Tavormina, P.A. 1967. Lytic action of lysostaphin on susceptible and resistant strains of *Staphylococcus aureus*. *Canadian Journal of Microbiology* 13, 845-853.