

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO  
AMBIENTE

**EXPRESSÃO E CARACTERIZAÇÃO DO POLIMORFISMO GENÉTICO DO  
SISTEMA QUÓRUM SENSING AGR; SUSCETIBILIDADE AOS  
ANTIMICROBIANOS E FATORES DE VIRULÊNCIA EM ISOLADOS  
CLÍNICOS E ALIMENTARES DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS***

JAQUELINE BECKER PINTO

Bacharel em Farmácia com Ênfase em Análises Clínicas

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil

Março de 2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO  
AMBIENTE

**EXPRESSÃO E CARACTERIZAÇÃO DO POLIMORFISMO GENÉTICO DO  
SISTEMA QUÓRUM SENSING AGR; SUSCETIBILIDADE AOS  
ANTIMICROBIANOS E FATORES DE VIRULÊNCIA EM ISOLADOS  
CLÍNICOS E ALIMENTARES DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS***

JAQUELINE BECKER PINTO

Bacharel em Farmácia com Ênfase em Análises Clínicas

Dissertação apresentada ao Programa  
de Pós-Graduação em Microbiologia  
Agrícola e do Ambiente como um dos  
requisitos para a obtenção do Grau de  
Mestre em Microbiologia Agrícola e do  
Ambiente

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil

Março de 2014

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a todas as pessoas (professores, colegas de pós, funcionários) que me ajudaram durante estes dois anos de mestrado e contribuíram com o desenvolvimento da minha pesquisa.

Às colegas do laboratório 164: Tiele, Ana Bárbara, Ana Paula, Daniele, Themis, Paula, Marcela, Carol, Fernanda e Aline pela convivência e apoio.

Agradeço ao Mateus, que sempre foi um companheiro, e em inúmeros momentos me ajudou pacientemente no laboratório, nas cadeiras e na dissertação.

Aos colegas do laboratório 208 e 209, pelo auxílio que sempre obtive quando solicitado. Em especial, a Michele, Naiara e Tiane, pela ajuda, pelo companheirismo e pelos momentos de descontração. Senti-me acolhida, mesmo não fazendo parte do laboratório. Com certeza tornaram meus dias mais divertidos e felizes.

A faculdade de Farmácia da UFRGS pela minha formação, agradeço a Usha e a Aninha, por todos os ensinamentos, por terem, sobretudo, me apresentado o mundo da bacteriologia. Foram pessoas muito importantes para definição do meu caminho na pesquisa e agora na minha vida profissional.

Em especial a Aninha, por ceder as amostras para a realização do meu projeto de mestrado. Mas principalmente pela amizade e por todo incentivo, tem todo o meu carinho e minha admiração para sempre. Agradeço ao Leandro pelas orientações importantes para o mestrado e por estar sempre disponível em ajudar.

A minha amiga Jéssica, companheira na pesquisa ao longo destes últimos cinco anos, sou muito grata pelas diversas vezes que me auxiliou no meu trabalho.

Agradeço aos meus familiares, em especial aos meus irmãos, são meu orgulho e meu porto seguro. Aos meus pais, pela educação que me deram e por terem me dado todas as direções para que eu trilhasse meu caminho e pelo suporte fornecido para que eu pudesse fazer minhas escolhas.

Agradeço ao meu namorado Diego, por acreditar em mim, por ter sido sempre uma voz sensata e incentivadora. Por estar ao meu lado, pacientemente, entendendo todos os momentos que não foram fáceis, que exigiram muito de mim.

Agradeço as minhas amigas de faculdade: Juliana, Débora, Chris, Luisa e Bruna, por dividirem comigo ao longo dos últimos quase dez anos, todos os momentos da minha vida. Sou muito grata pela amizade de vocês.

Agradeço muito a minha orientadora, Ana, por ter me aceitado como aluna de mestrado. Por ter acreditado em mim, por ter me passando tranquilidade e confiança em diversos momentos. Por ter sido sempre extremamente acessível e sempre disposta a ajudar. Sobretudo, agradeço a compreensão e o apoio. Sou muito grata, pela orientação e a companhia agradável e alegre destes dois anos. És uma pessoa única e especial.

A CAPES, pelos recursos fomentados para a realização deste estudo.

# EXPRESSÃO E CARACTERIZAÇÃO DO POLIMORFISMO GENÉTICO DO SISTEMA QUÓRUM SENSING AGR; SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS E FATORES DE VIRULÊNCIA EM ISOLADOS CLÍNICOS E ALIMENTARES DE *Staphylococcus aureus*<sup>1</sup>.

Autor: Jaqueline Becker Pinto

Orientadora: Ana Paula Guedes Frazzon

## RESUMOS

*Staphylococcus aureus* é reconhecidamente causador de infecções humanas e um dos principais patógenos alimentares. O regulador gene acessório (Agr) é um sistema central que controla a expressão de diversos fatores de virulência. O polimorfismo do *locus agr* divide *S.aureus* em grupos genéticos distintos associados a determinados perfis patogênicos. O objetivo deste estudo foi comparar fenotipicamente e genotipicamente isolados clínicos e alimentares de *S.aureus*. Um total de 63 *S.aureus* (34 isolados de cateter venoso central (CVC) e 29 de carne de frango) foram selecionados para o estudo. O gene *sea* foi encontrado em 44,1% (15/34), *seb* em 5,9% (2/34) e *sec* em 8,8% (3/34) dos isolados de CVC. Em isolados de frango, apenas o gene *sea* foi detectado e foi observado em 31% (9/29). Somente 6% (2/34) dos isolados de CVC formaram biofilme. Já, em isolados de frango, 93% (27/29) foram formadores de biofilme ( $P < 0,01$ ). Nos isolados de CVC, os genes *icaA*, *atlA* e *sasG* envolvidos com a formação de biofilme estiveram presentes em 100% (34/34), 97% (33/34) e 100% (34/34), das amostras respectivamente, enquanto que, em isolados de carne de frango os mesmos genes foram detectados em 93% (27/29), 52% (15/29) e 100% (29/29), respectivamente. Cepas resistentes à penicilina foram detectadas em 86,2% dos isolados de carne de frangos e em 88,2%, dos isolados de CVC. Isolados de CVC foram resistentes a oxacilina e multirresistentes em 17,6% (6/34). Com relação ao polimorfismo do *locus agr*, os *S.aureus* isolados de CVC foram divididos em 3 grupos, onde 44% (15/34) tiveram o polimorfismo I, 38% (13/34) o II e 18% (6/34) o III. Os *S.aureus* isolados de carne de frangos, também foram divididos em 3 grupos, onde 86% (25/29) dos isolados tiveram o polimorfismo I, 10% (3/29) o II e 4%o III (1/29) ( $P < 0,05$ ). Entre os isolados de CVC, 88,2% (30/34) produziram a  $\delta$ -hemolisina, ou seja, expressavam o sistema Agr, já entre os isolados de frangos, apenas 3,3% eram  $\delta$ -hemolíticos ( $P < 0,05$ ). Conclui-se que os isolados diferiram quanto à capacidade de formação de biofilme, polimorfismo Agr e produção da  $\delta$ -hemolisina. No entanto, resultados similares foram observados quanto à detecção dos genes das enterotoxinas e os envolvidos com formação de biofilme. A análise molecular mostrou uma elevada similaridade entre os grupos o que pode indicar uma mesma origem destes isolados.

<sup>1</sup>Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente - Microbiologia de Alimentos. Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (142 p.) Março, 2014.

EXPRESSION AND CHARACTERIZATION OF GENETIC POLYMORPHISM OF AGR QUORUM SENSING SYSTEM; ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY AND VIRULENCE FACTORS IN *Staphylococcus aureus*. ISOLATED FROM CLINICAL AND FOOD<sup>2</sup>.

Author: Jaqueline Becker Pinto  
Supervisor: Ana Paula Guedes Frazzon

ABSTRACT

*Staphylococcus aureus* is recognized as cause of human infections and a one of the important foodborne pathogens. The accessory gene regulator (Agr) is a central system that controls the expression of several virulence factors. The polymorphism of the *agr locus* divided *S. aureus* into distinct genetic group associated with determinants of pathogenic profiles. The aim of this study was to the phenotypic and genotypic patterns of *S. aureus* isolated from clinical and food samples. A total of 63 *S. aureus* (34 from central venous catheter (CVC) and 29 from poultry meat) were selected for the study. The *sea* gene was found in 44.1% (15/34), *seb* in 5.9% (2/34) and *sec* in 8.8% (3/34) of CVC isolates. In poultry meat isolates, only *sea* gene was detected and it was observed in 31% (9/29). Only 6% (2/34) of CVC isolates formed biofilm. Further, 93% (27/29) of poultry meat isolates were biofilm formers ( $P < 0.01$ ). In CVC isolates, the *icaA*, *atlA* and *sasG* genes involved in biofilm formation were present in 100% (34/34), 97% (33/34) and 100% (34/34) of the isolates respectively, while in poultry meat isolates the same genes were detected in 93% (27/29), 52% (15/29) and 100% (29/29), respectively. Strains penicillin resistant was detected in 86.2% of poultry meat and 88.2% CVC isolates. CVC isolates were also oxacillin resistant and multiresistants in 17.6% (6/34). In regard to the polymorphism of *agr locus*, the CVC isolates were divided into 3 groups, where 44% (15/34) belong to polymorphism I, 38% (13/34) to II and 18% (6/34) to III. The *S. aureus* strains isolated from poultry meat were also divided into 3 groups, where 86% (25/29) showed the polymorphism I, 10% (3/29) the II and 4% (1/29) the III ( $P < 0.05$ ). Among the CVC isolates 88.2% (30/34) produced  $\delta$ -hemolysin, i.e., expressed the Agr system, in addition among the poultry meat isolates, only 3.3% were  $\delta$ -hemolytic ( $P < 0.05$ ). In conclusion, *S. aureus* isolated from CVC and poultry meat showed differences in their ability to form biofilm, Agr polymorphism and production of  $\delta$ -hemolysin. In conclusion, *S. aureus* isolated from CVC and poultry meat showed differences in their ability to form biofilm, Agr polymorphism and production of  $\delta$ -hemolysin. However, similar results were observed in relation to enterotoxin genes and those involved in biofilm formation. The molecular analysis show high genotypic similarity to *S. aureus* isolated from CVC and poultry meat, suggesting a common origin of these isolates, possible the human microbiota.

<sup>2</sup>Master of Science dissertation in Agricultural Microbiology, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (142 p.) March, 2014.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>ix</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>x</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....</b>	<b>xi</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1 Objetivo geral.....	3
1.2 Objetivos específicos.....	3
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>4</b>
2.1 Gênero <i>Staphylococcus</i> sp.....	4
2.2 Espécie <i>Staphylococcus aureus</i> .....	4
2.3 Mecanismos de virulência em <i>S.aureus</i> .....	6
2.4 Biofilme.....	9
2.4.1 Impacto do biofilme clinicamente.....	10
2.4.1.1 Infecções por <i>S. aureus</i> associadas ao uso de dispositivos médicos implantáveis.....	11
2.4.2 Impacto do biofilme na indústria de alimentos.....	13
2.4.3 Formação de biofilme em <i>Staphylococcus aureus</i> .....	14
2.5 Enterotoxinas estafilocócicas.....	17
2.6 Intoxicação alimentar estafilocócica.....	19
2.7 Sistema <i>quorum sensing</i> .....	21
2.7.1 Sistema <i>quorum sensing</i> Agr.....	22
2.7.1.1 Polimorfismo <i>locus agr</i> .....	25
2.7.1.2 Expressão do sistema Agr.....	28
2.8 Relação entre o sistema Agr e formação de biofilme.....	30
2.9 Resistência.....	31
2.9.1 Resistência a Beta-lactâmicos.....	32
2.10 Análises moleculares em <i>S.aureus</i> .....	34
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>38</b>
3.1 Isolados de <i>S.aureus</i> .....	38
3.1.1 Isolados <i>S.aureus</i> de carne de frango.....	38
3.1.2 Isolados <i>S.aureus</i> de cateter venoso central.....	38
3.2 Extração de DNA total.....	39
3.3 Confirmação genotípica da espécie.....	39

3.3.1 Amplificação da região 16S rRNA.....	39
3.3.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para detecção do gene da termonuclease termoestável estafilocócica ( <i>nuc</i> ).....	40
3.4 Detecção dos genes das enterotoxinas clássicas.....	41
3.4.1 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para detecção dos genes das enterotoxinas A ( <i>sea</i> ) e D ( <i>sed</i> ).....	41
3.4.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) Multiplex para detecção dos genes das enterotoxinas B ( <i>seb</i> ) e E ( <i>see</i> ).....	41
3.4.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para detecção dos gene das enterotoxina C ( <i>sec</i> ).....	42
3.5 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para detecção dos genes <i>icaA</i> , <i>atlA</i> e <i>sasG</i> .....	43
3.6 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) do gene <i>mecA</i> .....	44
3.7 Eletroforese em gel de agarose.....	45
3.8 Detecção do polimorfismo do <i>locus agr</i> .....	46
3.8.1 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para o <i>locus agr</i> .....	46
3.8.2 Detecção do Perfil de Polimorfismo por Restrição Enzimática (RFLP) do <i>locus agr</i> .....	47
3.9 Sequenciamento do <i>locus agr</i> .....	47
3.10 Detecção da formação de biofilme pelo teste da microplaca.....	47
3.11 Testes de susceptibilidade aos antimicrobianos.....	49
3.11.1 Teste por disco difusão.....	49
3.11.2 Suscetibilidade a oxacilina, vancomicina e teicoplanina através da técnica de microdiluição em caldo.....	50
3.12 Ensaio de expressão da $\delta$ -hemolisina.....	50
3.13 Análise molecular através do REP-PCR.....	51
3.13.1 Análise dos resultados de tipagem dos isolados.....	52
3.14 Análise estatística.....	52
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>53</b>
4.1 Isolados bacterianos.....	53
4.2 Detecção das enterotoxinas estafilocócicas.....	54
4.3 Suscetibilidade aos antimicrobianos.....	55
4.4 Determinação da produção de biofilme.....	58

4.5 Polimorfismo do <i>locus agr</i> .....	60
4.6 Expressão da $\delta$ -hemolisina.....	61
4.7 Relação entre produção de biofilme e genótipo <i>agr</i> .....	62
4.8 Prevalência dos genes envolvidos com a formação de biofilme entre os isolados de frangos e CVC de <i>S.aureus</i> .....	63
4.9 Relação entre formação de biofilme e expressão do <i>quorum sensing Agr</i> através da produção da $\delta$ -hemolisina.....	63
4.10 Diversidade genética dos isolados.....	64
4.11 Relação entre a diversidade genética, polimorfismo <i>agr</i> e perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos.....	71
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>74</b>
5.1 Detecção das enterotoxinas estafilocócicas.....	74
5.2 Suscetibilidade aos antimicrobianos.....	75
5.3 Determinação da produção de biofilme.....	77
5.4 Polimorfismo do <i>locus agr</i> .....	79
5.5 Expressão da $\delta$ -hemolisina.....	82
5.6 Relação entre produção de biofilme e genótipo <i>agr</i> .....	84
5.7 Prevalência dos genes envolvidos com a formação de biofilme entre os isolados de frangos e CVC de <i>S.aureus</i> .....	85
5.8 Relação entre formação de biofilme e expressão do <i>quorum sensing Agr</i> através da produção da $\delta$ -hemolisina.....	87
5.9 Diversidade genética dos isolados.....	89
5.10 Relação entre a diversidade genética, polimorfismo <i>agr</i> e perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos.....	91
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>94</b>
<b>7 PERSPECTIVAS.....</b>	<b>96</b>
<b>8 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>97</b>



## LISTA DE TABELAS

		Página
TABELA 1.	Sequências de oligonucleotídeos e temperaturas de anelamento para a amplificação de genes das enterotoxinas em <i>S.aureus</i> utilizados no estudo.....	43
TABELA 2.	Sequências de oligonucleotídeos, tamanho do fragmento amplificado e temperaturas de anelamento para a amplificação de genes <i>icaA</i> , <i>atlA</i> e <i>sasG</i> em <i>S. aureus</i> utilizados no estudo.....	44
TABELA 3.	Prevalência dos genes das enterotoxinas estafilocócicas clássicas entre isolados de <i>S.aureus</i> de CVC e carnes de frango congeladas e resfriadas.....	54
TABELA 4.	Perfil de resistência dos <i>S.aureus</i> isolados de CVC e carne de frango.....	56
TABELA 5.	Distribuição das CIMs para oxacilina em <i>S.aureus</i> isolados de frangos e CVC .....	57
TABELA 6.	Distribuição das CIMs para vancomicina em <i>S.aureus</i> isolados de frangos e CVC .....	57
TABELA 7.	Distribuição das CIMs para teicoplanina em <i>S.aureus</i> isolados de frangos e CVC.....	57
TABELA 8.	Classificação quanto à capacidade de formação de biofilme em <i>S.aureus</i> isolados de CVC e carne de frango.	59
TABELA 9.	Perfis de restrição enzimática locus <i>agr</i> em <i>S.aureus</i> , de cateter venoso central e carne de frango clivados com a endonuclease de restrição <i>Scal</i> .....	61
TABELA 10.	Correlação entre a expressão da $\delta$ -hemolisina e origem dos isolados de <i>S.aureus</i> .....	62
TABELA 11.	Relação entre polimorfismo <i>agr</i> e formação de biofilme em <i>S.aureus</i> isolados de CVC e carne de frango.....	63
TABELA 12.	Correlação entre a funcionalidade do sistema <i>Agr</i> através da expressão da $\delta$ -hemolisina e formação de biofilme em <i>S. aureus</i> isolados de CVC e carne de frango.....	64
TABELA 13.	Características dos <i>S.aureus</i> isolados de CVC e frangos e comparação entre os métodos de tipagem.....	72

## LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1. Fases do desenvolvimento do biofilme.....	15
FIGURA 2. Sistema <i>quorum sensing</i> em <i>Staphylococcus</i> sp.....	23
FIGURA 3. Estrutura dos quatro PAIs em <i>S.aureus</i> .....	26
FIGURA 4. Eletroforese em gel de agarose 1,5 % dos produtos de amplificação do gene <i>nuc</i> em <i>Staphylococcus aureus</i> .....	53
FIGURA 5. Gráfico em barra demonstrando a média dos valores de densidade óptica na formação de biofilme em <i>S.aureus</i> isolados de cateter venoso central e carne de frango.....	59
FIGURA 6. Digestão dos produtos de amplificação do locus <i>agr</i> com enzima de restrição <i>ScaI</i> em isolados de <i>S. aureus</i> .....	60
FIGURA 7. Os 11 perfis de bandas (A, B, C, D, E, F, G, H, I, J e L) dos isolados de <i>S.aureus</i> de CVC e carne de frangos, gerados pelo REP-PCR.....	65
FIGURA 8. Dendograma do REP-PCR dos 63 <i>S.aureus</i> isolados de de carne de frango (n=29) e CVC (n=34).....	68
FIGURA 9. Dendograma do REP-PCR dos 34 <i>S.aureus</i> isolados de CVC.....	69
FIGURA 10. Dendograma do REP-PCR dos 29 <i>S.aureus</i> isolados de carne de frango.....	70

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Agr: regulador gene acessório  
AgrA: proteína regulador de resposta AgrA  
AgrB: proteína AgrB  
AgrC: proteína sensor de resposta AgrC  
APC: célula apresentadora de antígenos  
ATCC: *American Type Culture Collection*  
AtlA: proteína autolisina A  
*atlA*: gene da autolisina A  
Bap: proteína associada a biofilme  
BHI: *Brain Heart Infusion*  
Blast: *basic local alignment search tool*  
CA-MRSA: *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina adquirida na comunidade  
CDC: *Centers for Disease Control and Prevention*  
CEF: cefoxitina  
CIM: concentração inibitória mínima  
ClfA: fatores de aglomeração A  
ClfB: fatores de aglomeração B  
CLI: clindamicina  
CLO: cloranfenicol  
CLSI: *Clinical and Laboratory Standards Institute*  
CVC: cateter venoso central  
DNAe: DNA extracelular  
DNA: Ácido Desoxirribonucleico  
DO: densidade óptica  
DTAs: Doenças Transmitidas pelos Alimentos  
*dru*: unidade de repetição direta do gene *MEC*  
ECM: matriz extracelular do hospedeiro  
EDTA: Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético  
ERI: eritromicina  
ETA: toxina esfoliativa A  
ETB: toxina esfoliativa B  
ETD: toxina esfoliativa D  
FnBPA: proteína de ligação a fibronectina A  
FnBPB: proteína de ligação a fibronectina B  
GEN: gentamicina  
GenBank: Banco de Dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*)  
gene *agrA*: gene da proteína AgrA  
gene *agrB*: gene da proteína AgrB  
gene *agrC*: gene da proteína AgrC  
gene *agrD*: gene da proteína AgrD  
gene *coa*: gene da coagulase  
gene *hld*: gene da  $\delta$ -hemolisina  
gene *lcaA*: gene da proteína lcaA

*gene icaB*: gene da proteína IcaB  
*gene icaC*: gene da proteína IcaC  
*gene icaD*: gene da proteína IcaD  
*gene nuc*: *gene* da termonuclease termoestável estafilocócica  
*gene sasG*: gene da proteína G de superfície  
*gene sea*: gene da enterotoxina A  
*gene seb*: gene da enterotoxina B  
*gene sec*: gene da enterotoxina C  
*gene sed*: gene da enterotoxina D  
*gene see*: gene da enterotoxina E  
*gene spa*: gene da proteína A  
*gene 16S rRNA*: Gene da subunidade 16S do RNA ribossômico  
 GISA: resistência intermediária aos glicopeptídeos.  
 HA-MRSA: *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina isolados do ambiente hospitalar  
 Hla: hemolisina  $\alpha$   
 Hlg: hemolisina  $\gamma$   
 Hlb: hemolisina  $\beta$   
 Hld: hemolisina  $\delta$   
 hVISA: heterogênea resistência intermediária a vancomicina  
 IAE: Intoxicação alimentar estafilocócica  
*icaADBC*: operon *ica*  
 Kb: Kilobase  
 LA-MRSA: *Staphylococcus aureus* relacionado a animais da fazenda  
 LEV: levofloxacino  
 LPV: Leucocidina Panton-Valentine  
 LukAB: leucocidina subunidade A e subunidade B  
 LukDE: leucocidina subunidade D e subunidade E  
 LukFM: leucocidina subunidade F e subunidade M  
 LukGH: leucocidina subunidade G e subunidade H  
*mecA*: gene que codifica resistência a meticilina  
 mg: miligrama  
 MgCl<sub>2</sub>: cloreto de magnésio  
 MGE: elemento genético móvel  
 MHC: complexo principal de histocompatibilidade  
 Min.: minutos  
 mL: mililitros  
 MLST: tipagem da sequência multilocus  
 mM: milimolar  
 MM: marcador molecular  
 MRSA: *Staphylococcus aureus* Resistente à Meticilina  
 MSSA: *Staphylococcus aureus* sensível à meticilina  
 MSCRAMMs: moléculas de adesão a superfície da matriz adesiva  
 ng: Nanogramas  
 PAI: peptídeo autoindutor  
 pb: pares de bases  
 PBP2a: proteína de ligação à penicilina de baixa afinidade  
 PCR: reação em cadeia da polimerase

PEN: penicilina  
PFGE: eletroforese em gel de campo pulsado  
pH: Potencial de Hidrogênio Iônico  
PIA: adesina intercelular polissacarídea  
PNAG: poli-N-acetil-b-1,6-glicosamina  
PSMs: modulinas solúveis em fenol  
PT: exotoxinas pirogênicas superantigênicas  
QS: *Quorum sensing*  
RAPD: PCR do DNA polimórfico randômico amplificado  
RFLP: PCR do polimorfismo do fragmento de restrição  
REP-PCR: PCR do elemento repetitivo  
RIF: rifampicina  
RNAIII: molécula de RNA efetora de resposta  
rRNA: Ácido Ribonucleico Ribossomal  
s: desvio padrão  
SAgs: Superantígenos  
SasG: proteína G de superfície  
SCCmec: elemento cassete cromossômico estafilocócico *mec*  
SCP: *Staphylococcus* coagulase positivo  
SCN: *Staphylococcus* coagulase negativo  
SDS: Dodecil Sulfato de Sódio  
SEs: enterotoxinas estafilocócicas  
SEA: enterotoxina A  
SEE: enterotoxina E  
SEG: enterotoxina G  
SEH: enterotoxina H  
SEJ: enterotoxina J  
SEK: enterotoxina K  
SEV: enterotoxina V  
SSSS: exfoliatina responsável pela síndrome da pele escaldada estafilocócica  
ST: tipo de sequência  
TAE: Tampão Tris-Acetato-EDTA  
Taq polimerase: Enzima polimerase extraída da bactéria *Thermus aquaticus*  
TE: Tampão Tris-EDTA  
TET: tetraciclina  
TSA: ágar triptona de soja  
TSB: caldo triptona de soja  
TSST-1: toxina da síndrome do choque tóxico 1  
UV: ultra-violeta  
VISA: *Staphylococcus aureus* com Resistência Intermediária à Vancomicina  
VRSA: *Staphylococcus aureus* Resistentes à Vancomicina  
δ-hemolisina: delta hemolisina

## 1 INTRODUÇÃO

*Staphylococcus aureus* é uma bactéria comensal, pertencente à microbiota humana e animal que, por vezes, atua como patógeno oportunista e versátil, reconhecidamente causador de infecções humanas nosonômias e adquiridas na comunidade.

Esta espécie tem um vasto arsenal de fatores de virulência como proteínas da superfície celular, enzimas extracelulares, leucocidinas e exotoxinas, juntamente com a capacidade de formação de biofilme.

A capacidade de aderir a dispositivos médicos, como: cateteres, próteses ou outros dispositivos de longa permanência, e formar uma comunidade multicelular (conhecido como biofilme) é uma forma de virulência desenvolvida pelo *S.aureus*. Uma vez que estes biofilmes são estabelecidos, torna-se difícil combater as bactérias pelas defesas do hospedeiro e/ou ação de antimicrobianos.

A intoxicação alimentar estafilocócica (IAE) é uma das principais doenças transmitidas pelos alimentos (DTA). A presença de *S.aureus* em alimentos pode representar um risco à saúde pública uma vez que algumas cepas produzem enterotoxinas responsáveis pelos quadros de intoxicação. A

detecção dos genes das enterotoxinas estafilocócicas e a produção de enterotoxinas por *S. aureus* vem sendo determinada em diversos alimentos, de forma a determinar o potencial patogênico dos mesmos.

O regulador gene acessório (Agr) é um sistema central que controla a expressão de diversos fatores de virulência do *S.aureus*. O Agr regula positivamente a expressão de fatores de virulência secretados pela célula, como, exoproteínas, exoenzimas e toxinas, e negativamente atua regulando a expressão de fatores de virulência associados à célula, como as adesinas de superfície. O *locus agr* em estafilococos é polimórfico, podendo ser dividido em grupos genéticos distintos. A detecção deste polimorfismo tem possibilitado a associação com perfis patogênicos de *S.aureus*. Assim como a prevalência de determinados tipos, relacionados com o ambiente em que se encontra, como por exemplo, o ambiente hospitalar.

Em virtude do amplo uso de antimicrobianos no tratamento de infecções bacterianas em hospitais, o crescimento da resistência dos microorganismos nestes locais tem um papel de destaque. As infecções causadas por *Staphylococcus aureus* metilicina resistentes (MRSA) representa um sério problema para instituições de saúde. No entanto, fora do ambiente hospitalar, diversos relatos tem descrito infecções adquiridas na comunidade causadas por MRSA. Nos últimos anos, tem sido detectado também a presença de MRSA em amostras de carnes e aves, e produtos alimentares brasileiros.

Nesse contexto, este estudo visa a análise do polimorfismo do *locus agr*, a comparação da presença dos fatores de virulência e do perfil de resistência à antimicrobianos entre *S.aureus* isolados de cateter venoso

central (CVC) de pacientes internados e de isolados originados de carne de frango.

### **1.1 Objetivo geral**

Comparar os isolados alimentares e clínicos de *S.aureus*, quanto à expressão e o polimorfismo do *locus agr*, e a possível relação entre o polimorfismo genético, a virulência e os níveis de suscetibilidade a antimicrobianos.

### **1.2 Objetivos específicos**

A. Caracterizar o perfil polimórfico do *locus agr* dos isolados bacterianos através da técnica de RFLP.

B. Avaliar a expressão do sistema *quorum sensing* Agr através do ensaio fenotípico da  $\delta$ -hemolisina.

C. Determinar a capacidade de formação de biofilme dos isolados bacterianos.

D. Detectar a presença dos genes *sasG*, *icaA* e *atlA* envolvidos na formação de biofilme.

E. Detectar a presença dos genes codificadores das enterotoxinas clássicas (*sea*, *seb*, *sec*, *sed* e *see*).

F. Determinar o perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos.

G. Discriminar os isolados molecularmente através da técnica de REP-PCR.



## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Gênero *Staphylococcus* sp.

O gênero *Staphylococcus* pertence a família Micrococcaceae. Os micro-organismos pertencentes a este gênero se apresentam microscopicamente como cocos Gram-positivos que tendem a formar agrupamentos em pares, cadeias curtas ou em forma de cachos de uva, são catalase positivos, anaeróbios facultativos e não móveis (Bannerman, 2003).

*Staphylococcus* spp. possuem uma distribuição ubiqüitária na natureza, sendo seu reservatório primário a pele e membranas de mucosas de mamíferos e aves (Bannerman, 2003). Existem mais de 50 espécies e subespécies de estafilococos. O gênero compreende dois grandes grupos conforme a capacidade de coagular o plasma sanguíneo, os ditos coagulase positivos (SCP) e o grupo que não tem a capacidade de coagular o plasma, coagulase negativo (SCN) (Rogers et al., 2009). Este gênero produz inúmeros fatores de virulência que promovem sua sobrevivência e, conseqüentemente sua disseminação (Fleischer, 1991; Poindexter & Schlievert, 1986).

### 2.2 Espécie *Staphylococcus aureus*

O *Staphylococcus aureus* é a espécie mais patogênica do gênero estafilococos e o principal representante do grupo dos SCP. Esta bactéria pode ser distinguida de outras espécies de estafilococos pela pigmentação da

colônia na cor amarelo-ouro e os testes da fermentação do manitol e produção da desoxirribonuclease (Lowy, 1998).

Os seres humanos são considerados um reservatório natural de *S. aureus*. Acredita-se que acima de 30% das pessoas saudáveis são colonizadas, porque persistentemente carregam o *S. aureus* no epitélio escamoso úmido das narinas anteriores sem apresentar sintomas clínicos (Kuehnert et al., 2006; Lowy, 1998). Outras 60 % são consideradas portadoras intermitentes sem o aparecimento de sintomas (Gorwitz et al., 2008; Wertheim et al., 2004; Kluytmans et al., 1997).

Praticamente todas as espécies de animais de sangue quente podem ser colonizadas por *S. aureus* (Alves et al., 2009; Sung et al., 2008; Coelho et al., 2007). Dados mostram que a colonização por *S. aureus* em galinhas é cerca de 90 % (Nagase et al., 2002), em suínos 42% (Nagase et al., 2002), 29 % em ovelhas (Vautor et al., 2005), entre 14 % e 23 % em bovinos (Nagase et. Al., 2002; Roberson et. Al., 1994).

Apesar do *S. aureus* fazer parte da microbiota humana e animal, o carregamento de *S. aureus* é considerado um fator de risco para a infecção. Pessoas e animais colonizados estão em maior risco de desenvolver infecções (Peton & Loir, 2013; Peacock et al., 2001; Von Eiff et al., 2001).

Patógeno oportunista pode causar uma grande variedade de doenças graves (Almeida et al., 2013; Sader et al., 2001; Lowy, 1998). Em humanos, *S. aureus* está envolvido em infecções acometendo pacientes internados em hospitais e infecções adquiridas na comunidade (Ribeiro et al., 2007; Ribeiro et al., 2005; Sader et al., 2004; Diekema et al., 2001). O

tratamento das infecções desenvolvidas por esta bactéria torna-se mais difícil pelo surgimento de cepas multirresistentes (Gales et al., 2009; Sader et al., 2009). Em animais, *S. aureus* é considerado um dos agentes etiológicos mais frequentes causando grandes perdas econômicas principalmente para agropecuária (Sears & McCarthy, 2003; Seegers et al., 2003).

O *S.aureus* é um dos principais patógenos alimentares. A presença dessa espécie em alimentos pode representar um risco à saúde pública, uma vez que algumas cepas produzem enterotoxinas responsáveis pelos quadros de intoxicação alimentar estafilocócica (IAE). A ingestão de enterotoxinas estafilocócicas pré-formadas no alimento, tipicamente, causam violenta êmese, náusea e diarreia (Crago et al., 2012; Hennekinne et al., 2012; Loir et al., 2003; Balaban & Rasooly, 2000).

### **2.3 Mecanismos de virulência em *S.aureus***

*Staphylococcus aureus* é uma bactéria comensal, que, por vezes transforma-se num patógeno, causando graves infecções e ameaçando a vida. As infecções são iniciadas quando uma violação da barreira da pele ou mucosa permite o acesso da bactéria aos tecidos adjacentes ou à corrente sanguínea (Lowy, 1998). Três síndromes básicas podem ser causadas: (i) lesões superficiais, como abscesso de pele e infecções de feridas, (ii) as infecções profundas e sistêmicas, como osteomielite, endocardite, pneumonia e bacteremia, e (iii) síndromes toxêmicas, como a síndrome de choque tóxico, escarlatina estafilocócica, síndrome da pele escaldada estafilocócica e intoxicação alimentar estafilocócica (Joo & Otoo, 2013; Kechrid et al, 2011;

Talan et al., 2011; Gales et al., 2009; Kallen et al., 2007; Diekema et al., 2001; Lina et al., 1997; Arbuthnott et al., 1990).

A virulência do *S.aureus* é multifatorial, dependendo da expressão de determinantes de virulência, envolvidos na evasão imune, adesão, entre outros. A aderência da bactéria ao tecido do hospedeiro é um passo fundamental para o processo de colonização e infecção. As proteínas associadas à superfície da célula que medeiam a ligação à matriz extracelular do hospedeiro, denominadas moléculas de adesão a superfície da matriz adesiva (MSCRAMMs), exercem este papel (Kuroda et al., 2008; Foster & Hook, 1998). Fazem parte desta família, os fatores de aglomeração A e B (ClfA e ClfB), a proteína A e as proteínas de ligação a fibronectina A e B (FnBPA e FnBPB) que apresentam um domínio de ancoragem à parede da célula bacteriana (Mazmanian et al., 2001; Navarra & Schneewind, 1999).

O *S.aureus* expressa uma variedade de exoproteínas que contribuem para sua capacidade de colonização e de causar doenças em hospedeiros mamíferos e aves, muitas destas são exotoxinas. As toxinas formadoras de poros, como hemolisina  $\alpha$  (Hla), hemolisina  $\gamma$  (Hlg) e Leucocidina Pantón-Valentine (LPV) atuam danificando membranas das células hospedeiras levando à lise celular e fortes efeitos pró-inflamatórios (Grumann et al., 2013; Holzinger et al., 2012; Kebaier et al., 2012; Perret et al., 2012; Masiuk et al., 2010; Von Eiff et al., 2004; Gillet et al., 2002)

Outras exotoxinas secretadas, tais como as duas hemolisinas  $\beta$  (Hlb) e  $\delta$  (Hld), também têm sido associadas à patogenicidade da bactéria. A Hlb teria capacidade de lisar os eritrócitos e propriedades de leucotoxicidade, já a

Hid atuaria danificando as membranas através da formação de poros (Grumann et al., 2013). As leucocidinas A/B (LukAB), D/E(LukDE), F/M (LukFM), G/H (LukGH) apresentam ação semelhante ao LPV (Grumann et al., 2013; Dumont et al., 2011; Ventura et al., 2010; Von Eiff et al., 2004). Outras moléculas mais recentemente descritas, envolvidas com a virulência da bactéria, são as modulinas solúveis em fenol (PSMs), família de pequenos péptidos anfipáticos helicoidais com propriedades citolíticas e pró-inflamatórias (Grumann et al., 2013; Periasamy et al., 2012; Tsompanidou et al., 2012).

As enterotoxinas (SEs) e a toxina da síndrome do choque tóxico 1 (TSST-1) são toxinas superantigênicas pirogênicas estruturalmente relacionadas que partilham vários graus de homologia na sequência de seus aminoácidos. Elas funcionam como superantígenos por ligação ao complexo principal de histocompatibilidade (MHC) classe II, causando grande proliferação de células T e a liberação de citocinas (Grumann et al., 2013; Holtfreter et al., 2007; Lowy, 1998; Marrack et al., 1990; Schlievert et al., 1981).

Há três conhecidas toxinas esfoliativas em *S. aureus*: a toxina esfoliativa A (ETA- cromossomal), a toxina esfoliativa B (ETB- plasmidial) e a toxina esfoliativa D (ETD). As toxinas esfoliativas epidermolíticas causam eritema cutâneo, que em conjunto ou isoladamente, estão implicadas na síndrome da pele escaldada estafilocócica (Grumann et al., 2013; Lowy, 1998; Bayles & Iandolo et al., 1989; Iandolo, 1989).

A capacidade de aderir a dispositivos médicos, como cateteres, próteses ou outros dispositivos de longa permanência, e formar uma

comunidade multicelular (conhecido como biofilme) também é uma forma de virulência desenvolvida pelo *S.aureus*. Uma vez que estes biofilmes são de difícil combate pelas defesas do hospedeiro e/ou ação de antimicrobianos (Rohde et al., 2007; Mack et al., 2006; Donlan & Costerton, 2002; Götz et al., 2000).

## **2.4 Biofilme**

Os biofilmes são agregados microbianos envoltos por uma matriz extracelular autoproduzida ou não que aderem a superfícies bióticas ou abióticas. A formação de biofilme é uma forma que os organismos procarióticos desenvolveram para sobrevivência em diversos ambientes (McDougald et al., 2011; Hall Stoodley et al., 2004; Gilbert et al., 2002; Mah et al., 2001).

As bactérias vivendo em biofilme assemelham-se a modelos de organismos multicelulares, comunicando-se entre si e apresentando variados níveis metabólicos nas diversas camadas de biofilme. Além disso, é sabido que células em diferentes regiões do biofilme podem exibir níveis diferentes de expressões gênicas (Costerton, 1999), e que, geralmente, exibem um crescimento e perfil de expressão gênica alterado, comparado àqueles das bactérias planctônicas, ou de vida livre (Yarwood & Schlievert, 2003; Donlan & Costerton, 2002).

Três mecanismos têm sido propostos para explicar a resistência dos biofilmes aos agentes antimicrobianos. O primeiro mecanismo que confere a proteção ao biofilme é a propriedade de barreira que o muco ou *slime* apresenta. Este mecanismo parece ser mais relevante para produtos químicos como alvejantes ou superóxidos, moléculas de agentes antimicrobianos e

imunoglobulinas, que são neutralizados ou ligados pelo exopolissacarídeo, principal componente da estrutura dos biofilmes, e efetivamente diluídos a concentrações subletais antes de poderem atingir todas as células individuais bacterianas dentro do biofilme. O segundo mecanismo envolve o estágio fisiológico dos organismos no biofilme. A criação de zonas de fase estacionária em biofilmes parece ser um fator significativo na resistência aos antimicrobianos das populações em biofilmes, visto que muitas drogas atuam em células bacterianas em crescimento ativo (Anderl et al., 2003; Walters et al., 2003; Spoering et al., 2001). O terceiro mecanismo de proteção é a existência de subpopulações de fenótipo resistente no biofilme, o qual tem sido referido como “*persisters*” (Spoering et al., 2001). *Persisters* são células variantes fenotipicamente resistentes aos agentes bactericidas. A sobrevivência destas células é em grande parte responsável pela recalcitrância de infecções causadas pelo biofilme bacteriano (Hall Stoodley et al., 2004).

#### **2.4.1 Impacto do biofilme clinicamente**

Infecções associadas a biofilmes têm especial relevância clínica. (Patel, 2005; Leid et al., 2002). Estimativas indicam que até 80% das infecções bacterianas crônicas são biofilme associadas (Antunes et al., 2011; Stewart & Costerton, 2001; Donlan & Costerton, 2002; Costerton et al., 1999). As infecções onde os biofilmes estão envolvidos comumente são endocardite (Monk et al., 2008), osteomielite (Lambe et al., 1991), infecções relacionadas a dispositivos implantáveis (Deva et al., 2013) e pneumonia em pacientes com fibrose cística (Ciofu et al., 2012; Donlan & Costerton, 2002; Costerton et al., 1999).

O biofilme no contexto clínico é capaz de ludibriar a resposta imunogênica do hospedeiro fazendo com que os anticorpos produzidos não consigam agir com eficiência nas células dentro do mesmo; sendo assim, raríssimas infecções são resolvidas apenas com mecanismos de defesa do hospedeiro. Além disso, a terapia antimicrobiana geralmente age apenas nas células planctônicas liberadas do biofilme, tornando assim recorrentes os sintomas infecciosos até que a comunidade séssil seja retirada do organismo (Pavithra & Doble 2008; Donlan & Costerton 2002; Costerton, 1999), contribuindo para a persistência crônica das bactérias no corpo humano.

#### **2.4.1.1 Infecções por *S. aureus* associadas ao uso de dispositivos médicos implantáveis**

*Staphylococcus aureus* juntamente com o grupo dos SCN são as espécies predominantemente isoladas nas infecções relacionadas com dispositivos médicos implantáveis de longa permanência, como CVC, dispositivos cardiovasculares, válvulas e marca-passos cardíacos e próteses articulares (Otto, 2013; Joo & Otto, 2012; Periasamy et al., 2012; Rohde et al., 2007; Ruhe & Menon, 2006; Zimmerli et al., 2004; Knobloch et al., 2002).

A utilização de dispositivos médicos, como CVC é amplamente difundida na prática médica no mundo inteiro. Somente nos EUA 180 milhões de cateteres intravasculares periféricos e 7 milhões de CVC são utilizados anualmente (Rogers et al., 2009). O uso de CVC para acesso vascular e monitorização hemodinâmica tornou-se uma parte central da medicina moderna. No entanto, estes dispositivos estão associados a um número significativo de complicações, incluindo as infecções de corrente circulatória,



que resultam em maior mortalidade, custos hospitalares e aumento no tempo de internação em todo o mundo (Salomao et al., 2008; Templeton et al., 2008; Sader et al., 2002).

As infecções se desenvolvem quando a integridade da barreira cutânea é rompida, como no momento da implantação, onde as bactérias utilizam os dispositivos médicos implantáveis como veículos para penetrar no organismo hospedeiro (Von Eiff et al., 2002). Uma vez que o dispositivo está em contato direto com a corrente circulatória, a superfície do material polimérico torna-se rapidamente revestida com uma película de condicionamento constituída principalmente por componentes do soro, proteínas da matriz extracelular, tais como a albumina, fibrinogênio, fibronectina e laminina, derivados do hospedeiro. Este depósito forma um filme que dá condições a aderência das bactérias (Donlan & Costerton, 2002; Gotz, 2002; Lowy, 1998; Foster et al., 1997).

A capacidade de aderir e formar biofilmes nestes dispositivos médicos implantáveis é um fator de virulência importante no desenvolvimento das infecções relacionadas a estes dispositivos (Otto, 2013; Donlan & Costerton, 2002). O tratamento destas infecções é cada vez mais problemático porque as células incorporadas em biofilmes podem destacar-se desta estrutura, resultando em infecções da corrente sanguínea, endocardite, embolia, e espalhamento metastático (Otto, 2013; Fitzpatrick et al., 2005; Mermel et al., 2001).

#### 2.4.2 Impacto do biofilme na indústria de alimentos

O interesse em estudar os biofilmes microbianos na indústria de alimentos tem se desenvolvido nos últimos anos. Biofilmes formados em ambientes de processamento de alimentos são uma fonte persistente de contaminação microbiana que pode levar à deterioração de alimentos, ameaçando a qualidade microbiológica, segurança dos produtos alimentares, transmissão de doenças e também perdas econômicas (Giaouris et al., 2013; Rodrigues et al., 2010; Sofos & Geornaras, 2010; Van Houdt & Michiels, 2010; Jessen & Lammert, 2003; Zottola & Sasahara, 1994).

*Staphylococcus aureus* é uma bactéria patogênica capaz de desenvolver biofilmes em superfícies de processamento de alimentos. Diversos estudos já descrevem a capacidade do *S. aureus* de origem alimentar de aderir e formar biofilme em várias superfícies de contato com alimentos tais como o poliestireno, polipropileno, aço inoxidável, vidro e também em produtos alimentares (Vazquez-Sanchez et al., 2013; Bae et al., 2012; Gutierrez et al., 2012; Rodrigues et al., 2010; Sudagidan & Aydin, 2010; Xu et al., 2010; Rode et al., 2007).

A adesão de micro-organismos a superfícies de contato com alimentos é uma preocupação na indústria de alimentos, uma vez que as bactérias em biofilmes são de difícil eliminação, resistentes à limpeza e desinfecção. A dificuldade na eliminação contribui para a persistência de micro-organismos em ambientes de processamento de alimentos, conseqüentemente aumentando os riscos de contaminação cruzada (Giaouris et al., 2013; Rodrigues et al., 2010; Zottola & Sasahara, 1994).

### 2.4.3 Formação de biofilme em *Staphylococcus aureus*

O mecanismo pelo qual *S. aureus* forma biofilme é complexo e de múltiplos passos (Otto, 2013; Gotz, 2002). Sua estrutura é composta de uma matriz extracelular, contendo polissacarídeos, proteínas e DNA extracelular (DNAe) (Otto, 2013; Mann et al., 2009; Izano et al., 2008; Donlan & Costerton, 2002; Costerton et al., 1999).

A formação do biofilme ocorre em três etapas fundamentais (Figura 1). A primeira etapa corresponde à fase de adesão, onde a bactéria pode se aderir à superfície através de fatores inespecíficos, como hidrofobicidade e alterações eletrostáticas, ou envolvendo proteínas da matriz extracelular do hospedeiro (ECM), como o colágeno, fibronectina, fibrinogênio, laminina e vitronectina, ou através do depósito de material orgânico originado dos alimentos que formam um filme condicionante para adesão microbiana. Estas interações ocorrem através de proteínas, como por exemplo, autolisinas e adesinas presentes na membrana bacteriana (Giaouris et al., 2013; Otto, 2013; O'GARA, 2007; Zottola & Sasahara, 1994).

Na adesão inicial, proteínas da superfície bacteriana além de serem responsáveis pela ligação a proteínas da matriz extracelular, também atuam como adesinas no biofilme. Estas adesinas são denominadas proteínas da família MSCRAMM, que em muitos casos são covalentemente ancoradas a parede celular peptidoglicana (Mazmanian et al., 2001; Navarre & Schneewind, 1999; Foster & Höök, 1998; Vaudaux et al., 1995; Herrmann et al., 1988).

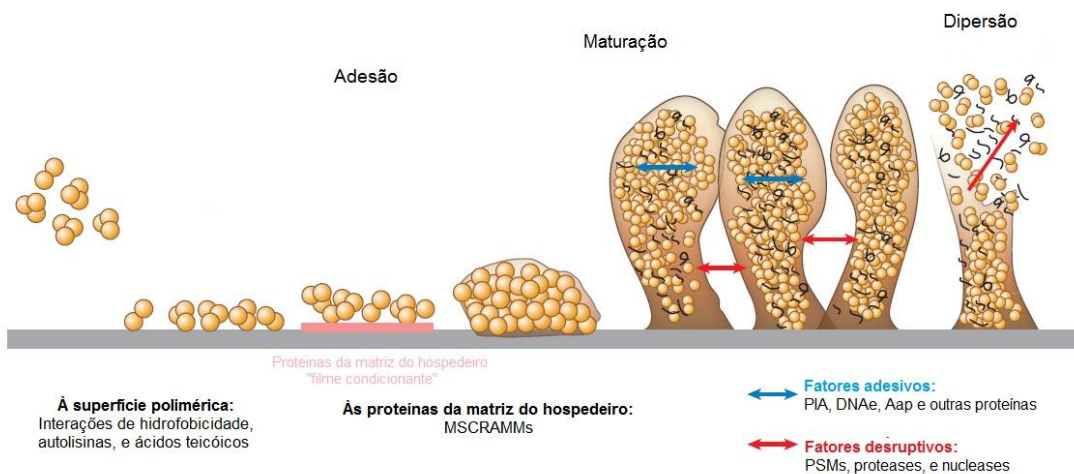


FIGURA 1. Fases do desenvolvimento do biofilme. O desenvolvimento do biofilme inclui adesão inicial, maturação e dispersão do biofilme. A adesão pode ocorrer diretamente à superfície ou através de um “filme condicionante” formado pela matriz do hospedeiro num modelo de infecção de dispositivos médicos. Determinantes moleculares envolvidos nas respectivas fases do biofilme estão ilustrados abaixo na figura (Adaptado de Otto, 2013).

A autolisina A (AtIA) medeia o atacamto inicial e é codificada pelo gene *atIA* (Biswas et al., 2006; Heilmann et al., 2005). A proteína AtIA tem domínio de ligação à parede celular e a vitronectina. O seu papel no processo de formação do biofilme é dirigir e expor as adesinas da superfície da célula corretamente, maximizar e assegurar uma interação eficaz com superfícies bióticas ou abióticas (Gotz, 2002). Outros trabalhos ainda relatam que a autolisina no biofilme teria papel na liberação de DNAe através da lise das células e a sua incorporação para dentro da matriz do biofilme (Mann et al., 2009).

Posteriormente, ocorre a fase de maturação do biofilme, que é caracterizada pela produção de fatores extracelulares que medeiam o contato bacteriano célula com célula, resultando na proliferação das células em

agrupamentos e a produção das multicamadas do biofilme, formando uma estrutura madura. *Staphylococcus* spp. pode mediar a adesão célula-célula usando dois tipos de exopolímeros: a adesina intercelular polissacarídea (PIA) e determinadas proteínas (O’GARA, 2007).

O mecanismo predominante na fase de acumulação do biofilme em *Staphylococcus* spp. é através da PIA, matriz extracelular polissacarídea autoproduzida, na qual as bactérias ficam envolvidas. A PIA é também conhecida como poli-N-acetil-b-1,6-glicosamina (PNAG) e sintetizada por enzimas codificadas pelo operon *icaADBC* (Gotz, 2002; Maira-Litran et al., 2002; Cramton et al., 1999). O operon *ica* (*icaADBC*) consiste em quatro regiões codificantes. O gene *icaA* e *icaD* juntos sintetizam oligômeros utilizando UDP-N-acetilglicosamina, como substrato. O produto do gene *icaC* está envolvido na translocação do polissacarídeo crescente para a superfície da célula. O proteína IcaB ligada à superfície é, então, responsável pela desacetilação da molécula de poli-N-acetilglicosamina (O’Gara, 2007; Gotz, 2002).

O acúmulo também poder ocorrer independente da produção de PIA, através da expressão de proteínas de superfície, como a proteína associada a acumulação, a proteína G de superfície (SasG) (Geoghegan et al., 2010; Kuroda et al., 2008; Corrigan et al., 2007), proteína A (Merino et al., 2009) e a proteína associada a biofilme (Bap), que é somente expressa em cepas bovinas de *S.aureus* (O’Gara, 2007; Cucarella et al., 2001). Estas proteínas são capazes de mediar a acumulação intercelular (Geoghegan et al., 2010; O’Gara, 2007).

A proteína SasG apresenta um domínio A N-terminal e repetidos domínios B, quando exposta na superfície celular, o domínio B é clivado resultando na liberação de fragmentos da proteína com diferentes tamanhos. Algumas destas moléculas liberadas associam-se com domínios B expostos na superfície da célula, que permanecem aderidos a mesma, formando uma rede de oligomerização ou fibrilar na superfície celular. Assim, através dos domínios B clivados e expostos da SasG, as células próximas interagem umas com as outras em um modo dependente de  $Zn^{2+}$ , levando ao acúmulo celular e formação de biofilme (Geoghegan et al., 2010; Kuroda et al., 2008; Corrigan et al., 2007).

A última fase corresponde ao despreendimento das células dos biofilmes estabelecidos, permitindo a bactéria espalhar-se e colonizar novos sítios (Otto, 2013; McDougald et al., 2011). O despreendimento das células do modo *slime* para vida planctônica apresenta papel crítico durante as infecções associadas ao biofilme, pois permite às células se dispersarem através do sangue e outros fluidos corporais para novos sítios de infecção. As modulinas solúveis em fenol (PSM), moléculas com propriedades surfactantes, e proteases extracelulares apresentam papel importante nesta etapa de dispersão, desfazendo a estrutura do biofilme através da degradação de proteínas, como as adesinas e exopolímeros, componentes estruturais do biofilme (Otto, 2013; Periasamy et al., 2012; Boles & Horswill, 2008).

## **2.5- Enterotoxinas estafilocócicas**

Enterotoxinas estafilocócicas (SEs) pertencem a uma grande família de exotoxinas pirogênicas superantigênicas (PT) de estafilococos, que

partilham relações filogenéticas, estruturais, de função e sequência de homologia. As toxinas pirogênicas incluem SEs, TSST, ETA e ETB. Embora as exotoxinas pirogênicas estejam envolvidas em distintas patologias, elas têm atividades biológicas comuns: causam imunossupressão e proliferação não específica de células T (Grumann et al., 2013; Dinges et al., 2000; Van den Bussche et al., 1993).

Até o momento, já foram identificadas 21, sorologicamente distintas, toxinas SE ou toxinas tipo SE. Diferentes SEs têm sido descritas na ordem cronológica de sua descoberta. As SEs são divididas em diferentes tipos sorológicos, SEA até SEE, são as denominadas SEs clássicas, SEs mais recentes SEG até SEJ, e outras mais recentes SEK até SEV (Hennekinne et al., 2012; Ono et al, 2008; Thomas et al. , 2007; Omoe et al , 2005; Lina et al., 2004; Balaban & Rasooly, 2000; Bohach, 1987). As SEA até SEE e SEH têm sido claramente demonstradas como sendo capazes, de maior ou menor, atividade emética. (Hennekinne et al ., 2012; Loir et al., 2003).

As SEs são resistentes a condições ambientais (congelamento, secagem, tratamento térmico e baixo pH) que facilmente destroem as células bacterianas. Elas são também resistentes a enzimas proteolíticas retendo a sua atividade no trato digestivo após a ingestão. Geralmente, os tratamentos térmicos utilizados comumente no processamento de alimentos não são eficazes para a destruição completa das SEs (Hennekinne et al., 2012).

As enterotoxinas, além de funcionar como potentes agentes eméticos, também atuam como superantígenos que estimulam a proliferação não específica de células T e causam choque tóxico (Van den Bussche et al.,

1993). Superantígenos (SAGs) ao contrário dos antígenos convencionais, não precisam ser processados por células apresentadoras de antígenos (APC), antes de serem apresentados às células T (Thomas et al., 2009; Pumphrey, et al., 2007; Li et al., 1999). Isto conduz à ativação não específica de um grande número de células T, seguido pela proliferação e maciça liberação de interleucinas, quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias que podem levar a síndrome do choque tóxico, potencialmente letal e pode estar envolvido no mecanismo de toxicidade da SE (Loir et al., 2003; Balaban & Rasooly, 2000).

## **2.6 Intoxicação alimentar estafilocócica**

Intoxicação alimentar estafilocócica (IAE) é uma das doenças de origem alimentar mais comuns no mundo (Lima et al., 2013; Crago et al., 2012; Hennekinne et al., 2012; Loir et al., 2003; Balaban & Rasooly, 2000). O *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) estima que mais de 185 mil casos e 1.753 hospitalizações de intoxicação alimentar estafilocócica ocorrem nos Estados Unidos por ano (CDC, 2002; Mead et al., 1999). Em 2009, a União Européia obteve um taxa de internação de 16,9% resultante de surtos alimentares estafilocócicos (EFSA, 2009).

No Brasil, entre os anos de 1999 a 2009 foram registrados 6.349 surtos de Doenças Transmitidas pelos Alimentos (DTAs) envolvendo 123.917 pacientes e 20,5 % dos casos foram causados por *Staphylococcus* spp. No estado do Rio Grande do Sul, entre os anos de 1999 a 2005 foram notificados 1.275 surtos, dos quais o *S. aureus* foi responsável por 11,7% (Brasil, 2009).

Os quadros de intoxicação são causados após a ingestão de SEs pré-formadas no alimento, produzidas por cepas enterotoxigênicas de *S.aureus*



(Hennekinne et al., 2012; Normanno et al., 2005; Le Loir et al., 2003; Lowy, 1998). O tratamento com aquecimento do alimento é capaz de matar a bactéria. No entanto, a estabilidade das SEs produzidas torna o *S.aureus* uma das principais causas de DTA (Le Loir et al., 2003).

Os sintomas são caracterizados por náuseas, cólicas abdominais, gastroenterite, vômitos, dor abdominal e diarreia (Holmberg & Blake, 1984), dentro de 1 a 6 h após consumo de alimentos contaminados (EUA *Food and Drug Administration*, 1998). O período de incubação e a gravidade dos sintomas observados dependem da quantidade de enterotoxinas ingeridas e a susceptibilidade de cada pessoa. Na maioria dos casos, a recuperação ocorre dentro de 24 a 48 h sem tratamento específico, ao passo que a diarreia e fraqueza geral podem durar 24 horas ou mais.

A detecção dos genes das enterotoxinas estafilocócicas e a produção de SE por *S. aureus* vem sendo determinada em diversos alimentos, de forma a determinar o potencial patogênico dos mesmos (Moura et al., 2012; Spanu et al., 2012; Wendlandt et al., 2012; Haran et al., 2011; Pereira et al., 2009).

Os alimentos mais frequentemente envolvidos em surtos são o leite, a carne e, ambos os seus derivados (Crago et al., 2012; Hennekinne et al., 2012; Haran et al., 2011; Pereira et al., 2009; Do Carmo et al, 2004; Loir et al., 2003; De Buyser et al., 2001; Balaban & Rasooly, 2000). Alimentos no qual o isolamento do *S. aureus* é bastante frequente.

A presença de *S. aureus* em alimentos é frequentemente atribuída ao manuseio inadequado por parte dos manipuladores envolvidos na produção

de alimentos. Produtos alimentares e as superfícies de contato do alimento são muitas vezes contaminados durante o processamento e embalagem (Weese et al., 2010; DeVita et al., 2007; Normanno et al., 2007; Wei & Chiou, 2002; Sattar et al., 2001). As estimativas do CDC são de que os manipuladores de alimentos infectados são responsáveis por 20 % das doenças alimentares bacterianas (EUA *Food and Drug Administration*, 2000).

A infecção ou colonização dos animais também tem sido descrita como mecanismo para a contaminação de alimentos por *S.aureus*. (Spanu et al., 2012; Greig & Ravel, 2009; Normanno et al., 2007). As bactérias já presentes no animal do qual a comida se origina, podem contaminar as carcaças durante o processo de abate. Além disso, os isolados podem ser transferidos diretamente de seres humanos e ferramentas contaminadas durante o processamento dos alimentos, como por exemplo, corte de carne crua, a manipulação da carne e a produção de produtos de carne (Weese et al., 2010; Pu et al., 2009).

### **2.7 Sistema *quorum sensing***

O sistema de comunicação celular ou *Quorum sensing* (QS) é um mecanismo de comunicação entre as células bacterianas que permite controlar a expressão de genes em resposta à sua densidade populacional através da secreção de moléculas autoindutoras. O sistema permite à bactéria se adaptar a condições ambientais desfavoráveis, tais como a baixa disponibilidade de nutrientes e o controle da expressão de genes de virulência (Frederix & Downie, 2011; Waters & Bassler, 2005).

### 2.7.1- Sistema *quorum sensing* Agr

O regulador gene acessório (Agr) é o principal sistema QS em *S.aureus*. O Agr é um regulador global que controla fatores envolvidos com a colonização, virulência e outras funções de genes acessórios em *S.aureus*. Ele controla um grande conjunto de genes, incluindo aqueles que codificam a maior parte das proteínas extracelulares e as associadas à parede celular (Novick & Geisinger, 2008; Novick, 2003; Dunman et al., 2001; Balaban & Novick, 1995).

O Agr em *S.aureus*, regula positivamente a produção de fatores de virulência secretados pela célula, como exoproteínas, exoenzimas (proteases, lipases, nucleases), toxinas, como a TSST-1 e enterotoxinas, e outros fatores de virulência, incluindo a  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\delta$ -hemolisina, e negativamente atua regulando a expressão de fatores de virulência associados à célula, como as proteínas de superfície, tais como proteína A, coagulase e adesinas de superfície associadas à célula, (ex: Componentes da superfície microbiana reconhecedoras de moléculas adesivas [MSCRAMMs]) (Novick & Geisinger, 2008; Novick et al., 2003; Benito et al., 2000; Vuong et al., 2000; Novick et al., 1993).

A regulação do sistema ocorre através da transdução de um sinal auto induzível dependente da densidade, representado por um peptídeo autoindutor (PAI) processado pós-transcricionalmente (Novick & Geisinger, 2008; Ji et al., 1997; Novick et al., 1993). O *locus agr* é composto por dois operons divergentes expressos pelos promotores P2 e P3. O operon P2 tem um tamanho de 3kb, contendo os genes *agrA*, *agrB*, *agrC* e *agrD*. A ação combinada dos produtos dos genes *agrD* e *agrB*, é a responsável pela síntese

do peptídeo autoindutor. O *agrD* codifica a sequência do PAI, e *agrB*, uma endopeptidase transmembrana, que atua no processamento e/ou excreção do PAI. Os produtos dos genes *agrC* e *agrA* codificam, respectivamente, um sensor de membrana e um regulador de resposta clássico do sistema de transdução de sinal de dois componentes (Novick & Geisinger et al., 2008; Novick et al., 1993) (Figura 2).

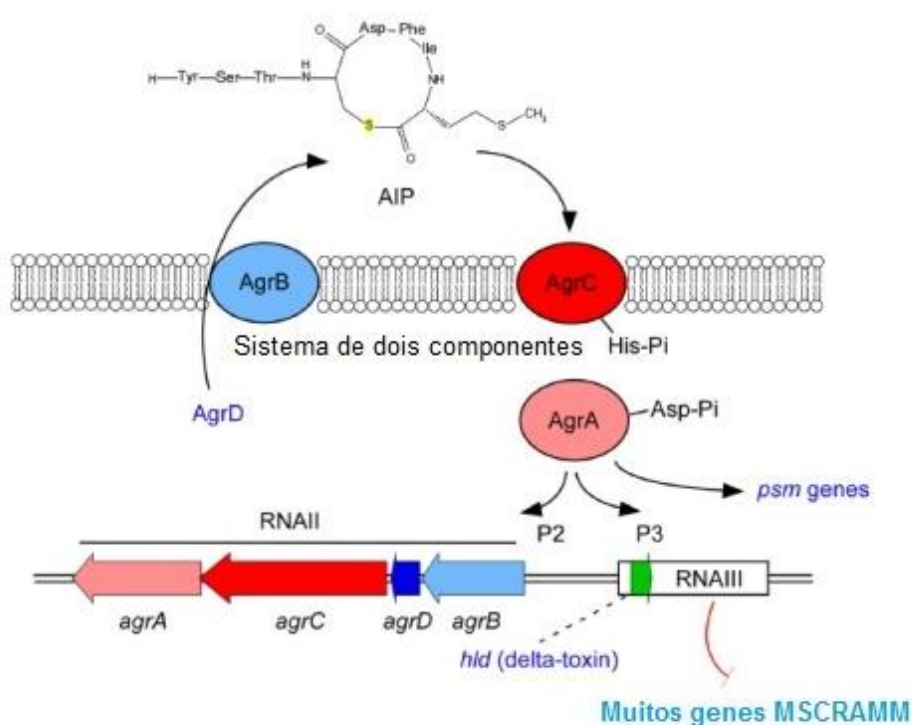


FIGURA 2. Sistema *quorum sensing* em *Staphylococcus* sp. O sistema *quorum sensing* contém os genes *agrA*, *agrC*, *agrD*, e *agrB* (transcrito RNA II) e RNA III, molécula efetora intracelular do sistema, que também contém o gene *hld* que codifica para a  $\delta$  hemolisina (Adaptado de Joo & Otto, 2012).

O sistema Agr é ativado quando o sensor de resposta AgrC, com seu domínio histidina fosfoquinase, recebe o sinal externo do peptídeo

autoindutor, fosforilando e ativando o regulador de resposta, AgrA. Desta forma, o PAI formado e secretado em altas concentrações, na fase logarítmica tardia de crescimento, é detectado pelo AgrC na membrana, que ativa AgrA, a qual irá ativar transcrição de ambos promotores, P2 e P3, amplificando desta forma a resposta do sistema e a expressão da molécula efetora, RNAIII, respectivamente (Novick & Geisinger et al., 2008; Novick et al., 1993).

O RNAIII, transcrito de 0.5 kb, representa o regulador de resposta do sistema Agr (Janzon et al., 1989). O RNAIII é abundante e estável, com uma estrutura secundária essencial para atividade regulatória. A principal via de regulação do RNAIII é em nível de transcrição gênica, mas, em alguns casos ocorre também na transdução. A molécula de RNAIII pode interagir diretamente com sequências regulatórias no DNA alvo ou atuar através de um mecanismo antisense regulando a tradução de determinados genes (Novick & Geisinger, 2008; Bendito et al., 2000; Morfeldt et al., 1996; Novick et al., 1993).

O único produto de tradução do RNAIII é a  $\delta$ -hemolisina, codificada pelo gene *hld*. A  $\delta$ -hemolisina é um peptídeo de 26 aminoácidos com característica anfipática, que não está envolvida em funções regulatórias do transcrito (Janzon et al., 1989). A detecção da expressão fenotípica da  $\delta$ -hemolisina vem sendo utilizada como um marcador da funcionalidade do sistema Agr (Viedma et al., 2014; Traber et al., 2008; Adhikari et al., 2007; Wright et al., 2005; Fowler et al., 2004).

### **2.7.1.1 Polimorfismo *locus agr***

O polimorfismo nos genes *agrD* e *agrC* resulta em alteração na sequência de aminoácidos do PAI e do seu correspondente receptor (AgrC). Em *S. aureus* o polimorfismo do *agr* resulta em quatro grupos principais de especificidade, I,II,III e IV; baseados na ligação específica do PAI com seu receptor de sinal (AgrC) (Figura 3) (Novick e Geisinger et al., 2008; Novick, 2003; Jarraud et al.,2000; Ji et al.,1997).

Na figura 3, pode-se verificar as diferenças na estrutura dos PAIs. Peptídeos autoindutores ativam seus receptores específicos enquanto inibem a ativação do sistema Agr ao se ligar em receptores *agrC* pertencente a outros grupos. Esta inibição é uma forma de interferência bacteriana que não resulta em uma inibição de crescimento, mas, sim, num bloqueio da expressão de genes acessórios, muitos destes, genes de virulência (Robinson et al., 2005; Goerke et al., 2003; Jarraud et al.,2000; Ji et al.,1997).

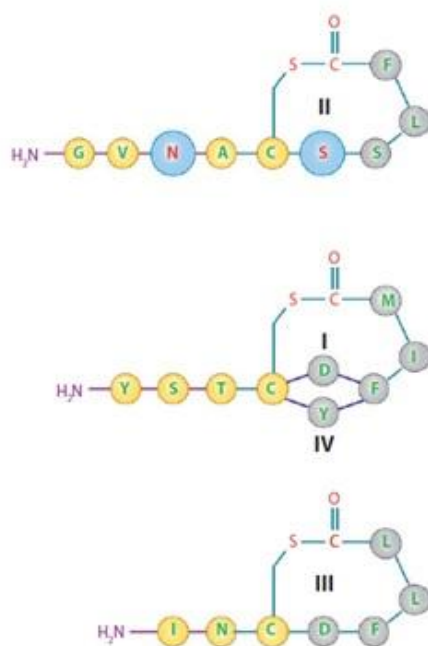


FIGURA 3. Estrutura dos quatro PAIs em *S.aureus*, dois resíduos chaves do PAI-II são mostrados em azul. PAIs I e IV diferem em um único sítio. PAI-II é um nonapeptídeo, I e IV octapeptídeo, e III é um heptapeptídeo (Adaptado de Novick & Geisinger et al., 2008)

O polimorfismo observado no *locus agr* faz parte de um evento primário evolutivo com significado biológico e relacionado a biotipos clínicos específicos. Acredita-se que cepas dentro de um determinado grupo Agr são mais relacionadas geneticamente e compartilham propriedades biológicas semelhantes (Novick & Geisinger, 2008; Wright et al., 2005; Moore & Lindsay, 2001; Dufour et al., 2002; Jarraud et al, 2002; Jarraud et al., 2000).

Uma relação entre características genéticas, grupos Agr, e tipos de infecção vem sendo determinado para *S.aureus*. Prévios trabalhos reportam uma maioria de isolados clínicos de *S.aureus* correspondendo ao grupo agr I, seguido do grupo II (Sanctis et al., 2011; Yoon et al., 2007; Jarraud et al., 2002; Moore & Lindsay, 2001). Os polimorfismos I e II vêm sendo relacionados em

diversas infecções, como endocardite (Jarraud et al., 2002), infecções com dispositivos implantáveis (Montanaro et al., 2010) e bacteremias (Sanctis et al., 2011).

Estudos vêm determinando a relação de isolados portando o grupo II com diminuição da susceptibilidade aos glicopeptídeos. O polimorfismo II tem sido associado com cepas de *S.aureus* com heterogênea resistência intermediária a vancomicina (hVISA) e resistência intermediária aos glicopeptídeos (GISA). Teoriza-se que isolados do grupo agr II possam ter uma vantagem intrínseca de sobrevivência durante a exposição aos glicopéptidos e, assim, podem ser mais capazes de desenvolver resistência (Hu et al., 2013; Tsuji et al., 2007; Moise-Broder et al., 2004; Sakoulas et al., 2003; Sakoulas et al., 2002).

O grupo III está envolvido com a síndrome do choque tóxico, pneumonia necrotizante e infecções causadas por *S.aureus* resistente a metilina adquiridos na comunidade (CA-MRSA). Isolados pertencentes a este grupo estão relacionados ao carregamento do elemento cassete cromossômico estafilocócico *mec* (SCCmec) tipo IV, responsável pela resistência em CA-MRSA (Vandenesch et al., 2003; Dufour et al., 2000); produção da toxina causadora do choque tóxico menstrual (TSST-1) (Peacock et al., 2002; Ji et al., 1995) e pela pneumonia necrotizante fulminante, causada pela leucocidina *Panton-Valentin* (PVL) (Gillet et al., 2002).

O polimorfismo IV é o menos prevalente entre os grupos Agr. Este polimorfismo está associado com síndromes generalizadas esfoliativas. Uma vez que a maioria das cepas produtoras de esfoliatinas responsáveis pela



síndrome da pele escaldada estafilocócica (SSSS) pertencem a este grupo (Jarraud et al., 2002 e 2000).

### **2.7.1.2 Expressão do sistema Agr**

*Staphylococcus aureus* é um organismo extremamente versátil, adaptável e flexível em suas interações com o ambiente ao seu redor. Podendo existir em locais inanimadas, bem como em vários nichos no hospederio animal. Esta versatilidade depende de uma grande variedade de sistemas adaptativos envolvendo a expressão de genes acessórios (Novick, 2003).

Assim, *S. aureus*, que normalmente é um comensal humano benigno, pode tornar-se um agente patogênico importante, quando consegue invadir tecidos do hospedeiro (Lowy, 1998). O sistema Agr tem um papel importante na modificação da relação do *S. aureus* com o seu hospedeiro (Yarwood & Schlievert, 2003).

Inicialmente, o sistema Agr não se encontra ativo e as bactérias presentes em pequenas quantidades expressam fatores de virulência presentes na superfície da célula, como as proteínas que promovem a fixação e colonização (Lyon & Novick, 2004; Yarwood & Schlievert, 2003).

A expressão do Agr tem papel importante durante as fases iniciais de uma infecção. Em alta densidade celular, como no desenvolvimento de uma infecção aguda, a bactéria reprime os fatores de colonização e inicia a expressão de exoproteínas e exotoxinas que atacam tecidos do hospedeiro, importantes para a virulência bacteriana e disseminação (Novick & Geisinger, 2008; Waters & Bassler, 2005; Lyon & Novick, 2004).

Durante fases posteriores, em infecções crônicas, esta expressão é drasticamente reduzida ou totalmente perdida. A perda de função Agr ajuda o patógeno a persistir em longo prazo no hospedeiro e contribuir para infecções persistentes, frequentemente associadas ao biofilme. O fato de que a atenuada regulação do agr é acompanhada pelo aumento da expressão dos fatores de aderência é consistente com esta hipótese (Yarwood & Schlievert, 2003). Assim, a persistência bacteriana é obtida à custa da redução da virulência (Yarwood et al., 2007; Goerke & Wolz, 2004; Goerke et al., 2003; Goerke et al., 2000; Vuong et al., 2000).

Em modelos experimentais em animais, está bem estabelecido que a expressão do Agr é um fator importante para a patogênese de abscessos de pele (Wright et al., 2005), endocardite (Cheung et al., 2004), artrite séptica (Abdelinour et al., 1993) e osteomielite (Gillaspy et al., 1995).

Dados mostram que a maioria dos isolados clínicos expressam o sistema Agr (Gagnaire et al., 2012; Novick e Gessinger, 2008; Traber et al., 2008). No entanto, o isolamento de cepas de *S.aureus*, a partir de material clínico, expressando pobremente, ou não expressando *agr* tem sido recorrente (Chong et al., 2012; Traber et al., 2008; Fowler et al, 2004; Goerke & Wolz, 2004; Sakoulas et al, 2002; Goerke et al., 2000; Vuong et al., 2000).

A perda da expressão pode ser devida a depressão metabólica ou ao surgimento de mutações (Shopsin et al., 2008; Traber et al., 2008; Somerville et al., 2002). A expressão de *agr* tem um grande custo metabólico para o micro-organismo (Sakoulas et al., 2009). A alta frequência de ocorrência natural de mutantes *agr* apoia a tese de que *agr* mutantes se adaptam a um

nicho ecológico em que as propriedades adesivas são importantes (Vuong et al., 2000).

### **2.8 Relação entre o sistema Agr e formação de biofilme**

O Agr é uma importante via regulatória entre o modo de vida planctônico e biofilme em *S.aureus*. A perda da função do Agr em *Staphylococcus* spp. confere uma maior capacidade de formação de biofilme (Boles & Horswill, 2008; Vuong et al., 2000). Contribuindo com isto, foi visto que mutantes Agr defeituosos de *S. aureus* aderem mais fortemente ao poliestireno e produzem biofilmes estáticos mais robustos do que cepas que expressam o Agr (Boles & Horswill, 2008; Yarwood et al., 2007; Vuong et al., 2000). Estudos têm demonstrado que a repressão do sistema Agr é necessária para o atacamento inicial e desenvolvimento do biofilme, e que a reativação do sistema resulta na dispersão do biofilme formado (Boles & Horswill, 2008).

O operon *agr* regula negativamente o desenvolvimento do biofilme por um mecanismo indireto, que não envolve a expressão de genes importantes para formação de biofilme (Vuong et al., 2000). A repressão ocorre na fase inicial de adesão, através da regulação negativa da expressão de adesinas que medeiam a ligação a superfícies abióticas, outras células e a superfícies biológicas (Novick & Geisinger, 2008).

O sistema Agr ativo contribui para dispersão das células bacterianas em biofilme e, conseqüentemente, uma nova colonização em novos sítios. Na dispersão, o controle exercido pelo Agr ocorre através da ativação da expressão de compostos com capacidade detergente e surfactante como a  $\delta$ -hemolisina e a classe das PSMs, peptídeos com propriedade surfactante, que

atuariam no destacamento do biofilme. A expressão da  $\delta$ -hemolina tem mostrado atuar na redução da capacidade de adesão das células ao poliestireno (Vuong et al., 2000). As PSMs têm um papel fundamental na estruturação e desprendimento de biofilmes de *S. aureus* (Periasamy et al., 2012). Boles & Horswill (2008) também demonstraram que o efeito principal de expressão de Agr é provocar a dispersão de um biofilme de *S. aureus* estabelecido, principalmente, através da produção de proteases.

### **2.9 Resistência aos antimicrobianos**

O uso generalizado de antimicrobianos na medicina humana, animal e na agricultura como promotores de crescimento, tem provocado um aumento exponencial na incidência de resistência em diversos grupos bacterianos nos últimos anos (Yucell et al., 2011; Sader et al., 2004; Barton, 2000). A presença de cepas resistentes tem consequências importantes em termos de saúde pública. Entre os estafilococos, cepas de *S. aureus* multirresistentes são de grande interesse em saúde pública porque tornam mais difíceis os tratamentos das infecções (Yucel et al., 2011).

Em virtude do amplo uso de antimicrobianos no tratamento de infecções bacterianas em hospitais, o crescimento da resistência dos microorganismos nestes locais tem um papel de destaque. Isolados clínicos apresentam os maiores índices de resistência, e cada vez mais, estes isolados se mostram resistentes a múltiplos antimicrobianos (Gales et al., 2009). Sabendo-se que pacientes portando estes patógenos saem do hospital, a disseminação da resistência em ambientes fora o hospitalar é uma tendência.

A utilização frequente de antimicrobianos na prática agrícola, destinados a fins terapêuticos ou como promotores de crescimento, tem resultado em uma pressão seletiva às bactérias neste segmento (Dibner & Richards, 2005). A constante exposição dos animais a estes produtos pode levar a seleção de uma microbiota resistente. Em virtude disso, a resistência vem sendo detectada em *S.aureus* isolados de animais e várias fontes alimentares originadas de animais, incluindo carnes, leites e aves (Yucel et al., 2011; Rizek et al., 2011; Marino et al., 2010; Pereira et al., 2009; Simeoni et al., 2008; Normanno et al., 2007; Gundogan et al., 2005; Kitai et al., 2005).

O alimento é considerado uma potencial rota de transmissão de bactérias resistentes a humanos. Essa transferência pode ocorrer através da transferência de patógenos resistentes originados do alimento ou dos seus genes de resistência para as bactérias que compõe a microbiota do trato gastro intestinal (Wendlandt et al., 2013; Rizek et al., 2011; Kitai et al., 2005; Normanno et al., 2007; Khan et al., 2000).

### **2.9.1 Resistência aos Beta-lactâmicos**

Resistência ao primeiro antibiótico, penicilina, surgiu na década de 40 (Barber & Dowzenko, 1948). Níveis elevados de resistência à penicilina são comumente encontrados em isolados clínicos e alimentares (Yucel et al., 2011; Pereira et al., 2009; Schito, 2006).

A metilina, antibiótico semissintético estável a ação das penicilinas, foi introduzida em 1959. No entanto, a resistência à metilina foi relatada muito rapidamente após a sua introdução (Jevons et al., 1963). O mecanismo subjacente de resistência à metilina tornava a bactéria resistente

a todas as classes de antibióticos beta-lactâmicos, incluindo as penicilinas, cefalosporinas e carbapenêmicos (Chambers et al., 1988). Resistência à meticilina em estafilococos é devida a presença do gene *mecA* adquirido através de um elemento genético móvel (MGE) chamado cassete cromossômico estafilocócico *mec* (SCCmec) (Katayama et al., 2000). O gene *mecA*, presente neste cassete, codifica uma proteína de ligação à penicilina de baixa afinidade 2a (PBP2a) responsável pela resistência à meticilina (Hartman & Tomasz, 1981).

*Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina isolados do ambiente hospitalar (HA-MRSA) são, com frequência, resistentes a múltiplas classes de agentes antimicrobianos, incluindo os aminoglicosídeos, clindamicina, macrolídeos, quinolonas, sulfonamidas e tetraciclina (Gales et al., 2009; Lutz & Barth, 2006; Sader et al., 2006; Sader et al., 2004; Diekema et al., 2001). Em um estudo multicêntrico de monitoramento da resistência antimicrobiana realizado pelo SENTRY *Antimicrobial Surveillance Program*, considerando hospitais brasileiros, no período de 2003 a 2008, foram verificadas taxas de resistência à oxacilina de 32% para *S.aureus* (Gales et al., 2009).

O surgimento de MRSA associado à comunidade (CA-MRSA), causando infecções fora dos serviços de saúde entre indivíduos saudáveis, passou a ser uma preocupação crescente (Deleo et al., 2010; Otto et al., 2010; Ribeiro et al., 2007; Ribeiro et al., 2005; Diekema et al., 2001). CA-MRSA são usualmente suscetíveis aos demais antimicrobianos, diferente das cepas HA-MRSA que normalmente carregam genes de resistência a outros antimicrobianos (Otto et al., 2010).

Nos últimos anos, o terceiro aparecimento significativo de *Staphylococcus aureus* tem sido relacionado a animais da fazenda (LA-MRSA) (Wendlandt et al., 2013; Fluit, 2012; Graveland et al., 2011). Vários estudos já descrevem a ocorrência de MRSA em uma variedade de animais, incluindo animais produtores de alimentos (Pantosti, 2012; Graveland et al., 2011; Pu et al., 2011; Vanderhaeghen et al., 2010).

Cepas de MRSA têm sido detectadas em diferentes alimentos, incluindo leites, queijo (Normanno et al., 2007), produtos de carne bovina (Van Loo et al., 2007) e de frango (Kitai et al., 2005). Em produtos alimentares brasileiros, Rizek et al. (2011) detectou a presença de MRSA em amostras de carnes e aves.

### **2.10 Análises moleculares em *S.aureus***

A tipagem epidemiológica em *S.aureus* é uma poderosa ferramenta para análise de cepas e auxilia para um controle de infecção eficaz dentro do hospital (Deplano et al., 2006 e 2000). A diferenciação de cepas como "igual" ou "diferente" fornece informações importantes para o controle das investigações para determinar a existência de um surto (Santos et al., 2001; Hartstein et al., 1997).

A caracterização molecular de *S.aureus* também tem sido utilizada para investigações epidemiológicas de surtos de intoxicação alimentares (Hennekinne et al., 2012; Kerouanton et al., 2007). Subtipos têm sido determinados em vários produtos alimentares para sugerir a fonte da contaminação (animal ou humana) (Hanning et al., 2012; Kerouanton et al., 2007; Wei & Chiou, 2002; Chiou et al., 2000).

Uma acurada e rápida tipagem epidemiológica é crucial para a identificação da fonte e dispersão da infecção e pode providenciar informação detalhada no surgimento de cepas resistentes e virulentas de *S.aureus*. Atualmente, vários sistemas de tipagem molecular têm sido utilizados para a tipagem de *S. aureus* (Sadoyama et al., 2008; Deplano et al., 2006; Santos et al., 2001).

A diferenciação de isolados de *S.aureus* em subtipos vem sendo obtida por técnicas como eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) (Deplano et al., 2000a), tipagem do gene da proteína A (*spa*) (Church et al., 2011), PCR do polimorfismo do fragmento de restrição (RFLP) do gene *coa* (Montesinos et al., 2002), tipagem da sequência multilocos (MLST) (Seong et al., 2013), PCR do DNA polimórfico randômico amplificado (RAPD) (Ye et al., 2012), tipagem da unidade de repetição direta (*dru*) associada ao gene *mec* (Ho et al., 2013) e PCR do elemento repetitivo (REP-PCR) (Deplano et al., 2000b).

O uso da técnica de PFGE para tipagem genética de *S. aureus* tem sido descrita em um grande número de trabalhos e demonstra ser um método adequado no que diz respeito à sua capacidade discriminatória. A técnica que permanece como padrão ouro para tipagem molecular de isolados *S.aureus* apresenta como maior vantagem os protocolos padronizados e o alto poder discriminatório (Sadoyama et al., 2008; Deplano et al., 2000; Hartstein et al., 1997).

Da mesma forma, MLST, que se baseia na análise da sequência de sete genes constitutivos, é altamente comparável entre laboratórios porque a



designação de um tipo de sequência (ST) é realizada através do banco do [www.mlst.net](http://www.mlst.net). Nos últimos anos, a tipagem MLST foi apresentada como o principal método para definir as relações filogenéticas entre as linhagens. Na comparação do MLST com o PFGE parece ser possível tirar conclusões muito semelhantes sobre a estrutura da população e ambos os métodos tem sido a primeira escolha para tipagem de alta precisão epidemiológica (Vincze et al., 2014; Hanning et al., 2012; Grundmann et al., 2002).

No entanto, o PFGE foi mostrado ser laborioso, fracamente reprodutível e comparável, entre os centros de pesquisa, e ainda, o MLST é uma técnica de alto custo laboratorial e tecnicamente exigente (Church et al., 2011; Belkum et al., 1998).

O REP-PCR vem sendo considerado um método alternativo para uma rápida investigação de surto e discriminação de cepas de *S.aureus* (Clarridge et al., 2013; Church et al., 2011; Sadoyama et al., 2008; Santos et al., 2001; Deplano et al., 2000b; Del Vecchio et al., 1995). O REP-PCR é um método rápido e reprodutível, que envolve amplificação por PCR utilizando oligonucleotídeos iniciadores que correspondem a sequências de elementos extragênicos repetitivos palindrômicos (Versalovic et al., 1991). Na técnica do REP-PCR, a distribuição aparentemente aleatória de tais repetições permite aos iniciadores oligonucleotídicos complementares gerarem padrões de fragmentos de DNA que são específicos para cepas individuais. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados hibridizam em um elemento palindrômico de 38pb repetitivo extragênico. A função destas sequências, até agora, não tem sido elucidada. Foram descritas pela primeira vez em

*Mycoplasma pneumoniae* (Wenzel & Hermann, 1988), que evoluiu a partir de bactérias Gram-positivas por redução do genoma, e gera fragmentos de DNA específicos de cepas de *S. aureus* (Santos et al., 2001; Del Vecchio et al., 1995).

## **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **3.1 Isolados de *Staphylococcus aureus***

#### **3.1.1 Isolados *S.aureus* de carne de frango**

Vinte e nove isolados de *S.aureus*, de um total de 50 isolados de SCP, isolados de amostras de carne de frango resfriado e congelado, foram utilizados neste trabalho. Estes isolados foram previamente identificados por Martins et al. (2013). As colônias foram reavaliadas quanto à morfologia da colônia, coloração de Gram, teste da catalase, coagulase, fermentação do manitol e estocadas em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) com 20% de glicerol a -20°C.

#### **3.1.2- Isolados *S.aureus* de cateter venoso central**

Trinta e quatro *S.aureus*, de um total de 224 isolados de *Staphylococcus* spp. de cateter venoso central (CVC) de distintos pacientes internados no Hospital de Clínicas de Porto Alegre no período de janeiro de 2008 a maio de 2009 foram utilizados neste estudo. Os isolados foram identificados previamente por Antunes et al. (2011). As colônias foram reavaliadas quanto à morfologia da colônia, coloração de Gram, teste da catalase, coagulase e fermentação do manitol.

### **3.2 Extração de DNA total**

Uma colônia foi inoculada em 5 mL de caldo BHI (Difco) e incubada sob agitação a 37 °C por 16-18 h. A cultura foi centrifugada por 5 min a 18.000 X g. O sobrenadante foi descartado e o pellet lavado 3 vezes com 1 mL de tampão TE-1X (Tris 10 mM, EDTA 1 mM – pH 7,8) e ressuspenso em 100 µL do mesmo tampão. Foi adicionado 100 µL de tampão de lise [20 mM Tris–HCl (Invitrogen), pH 7,4; 10 mM EDTA (Invitrogen), pH 8,0 e 200 mM NaCl (Nuclear); 100 µg de proteinase K (USB Corporation) e 1 % SDS (Promega)] e incubado, em banho, por 1 h a 55 °C. Posteriormente foi feita a extração padrão com fenol (Invitrogen) e precipitação com etanol (Pró-Análise) de acordo com protocolo de Sambrook & Russell (2001). O DNA foi tratado com 100 µg de RNase (Vivantis Technologies) e dissolvido em 100 µL TE (10 mM Tris pH 7,4; 1 mM EDTA pH 8,0). A quantificação de DNA foi determinada em gel de agarose 1,0 % (Invitrogen) corado com brometo de etídio [0,5 µg/ML (Promega)] e comparado com quantidades conhecidas de lambda DNA (Fermentas).

Para a realização das técnicas de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foram utilizadas quantidades de, aproximadamente, 20 ng de DNA.

### **3.3 Confirmação genotípica da espécie**

#### **3.3.1 Amplificação da região 16S rRNA**

A qualidade do DNA extraído foi avaliada através da amplificação da região do 16S, a partir do DNA genômico, do gene 16S rRNA por PCR utilizando os oligonucleotídeos iniciadores F-C27

(AGAGTTTGATCCTGGCTCAG)e R-530 (CCGCGGCTGCTG GCACGTA) (Gontang et al., 2007) para avaliação da qualidade do DNA extraído.

As reações foram otimizadas em 25 µL e continham 2 mM MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen), 2,5 pmol de cada primer (IDT), 1 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen), 1 x de tampão (Invitrogen), 300 µM de desoxinucleotídeos (ABgene) e água deionizada estéril (Milli Q plus, Millipore). As reações foram amplificadas em Termociclador Mastercycler Personal (Eppendorf) nas seguintes condições: 5 min a 94 °C; seguido por 35 ciclos de 45 segundos a 94 °C, 45 segundos a 58 °C e 45 segundos a 72 °C; e 5 min a 72 °C. O produto de PCR esperado de 530 pb foi analisado por eletroforese em gel de agarose.

### **3.3.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para detecção do gene da termonuclease termoestável estafilocócica (*nuc*)**

As amostras foram testadas para a presença do gene *nuc* utilizando o par de oligonucleotídeos iniciadores: F-*nuc* (GCGATTGATGGTGATACGGT) e R-*nuc* (CAAGCCTTGACGAACTAAAGC). As PCRs foram otimizadas em 25 µL e continham 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen), 10 pmol de cada *primer* (IDT), 1 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen), 1 x de tampão (Invitrogen), 200 µM de desorriboxinucleotídeos (ABgene) e água deionizada estéril (Milli Q plus, Millipore). As amplificações foram realizadas em Termociclador Mastercycler Personal (Eppendorf) nas seguintes condições: 5 min a 94°C, 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 60°C e 1 min a 72°C, a 5 min a 72°C. A cepa ATCC 25923 *S. aureus* foi utilizada como controle positivo. O produto de PCR esperado de 270 pb foi analisado por eletroforese em gel de agarose.

### **3.4 Detecção dos genes das enterotoxinas clássicas**

#### **3.4.1 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para detecção dos genes das enterotoxinas A (*sea*) e D (*sed*)**

As reações foram realizadas segundo Moura et al. (2012). As amostras foram testadas para a presença dos genes *sea* e *sed* utilizando os pares de oligonucleotídeos iniciadores demonstrados na tabela 1. As PCRs foram otimizadas em 25 µL e continham 1 mM MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen), 10 pmol de cada *primer* (IDT), 1 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen), 1 x de tampão (Invitrogen), 200 µM de desorriboxinucleotídeos (ABgene) e água deionizada estéril (Milli Q plus, Millipore). As amplificações foram realizadas em Termociclador Mastercycler Personal (Eppendorf) nas seguintes condições: 5 min a 94°C, 40 ciclos de 45 s a 94°C, 45 s a 54°C e 45 s a 72°C, a 5 min a 72°C (Moura et al., 2012). As seguintes cepas foram utilizadas como controle positivo: *S.aureus* ATCC 13565 (*sea*) e ATCC 23235 (*sed*).

#### **3.4.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) Multiplex para detecção dos genes das enterotoxinas B (*seb*) e E (*see*)**

As reações foram realizadas segundo Moura et al. (2012). As amostras foram testadas para a presença dos genes da enterotoxinas B (*seb*), e E (*see*) utilizando os pares de oligonucleotídeos iniciadores demonstrados na tabela 1. As reações da PCR foram otimizadas em 25 µL e continham 3 mM MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen), 5 pmol de cada *primer* (IDT), 1 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen), 1 x de tampão (Invitrogen), 300 µM de desoxirribonucleotídeos (ABgene) e água deionizada estéril (Milli Q plus, Millipore). As amplificações foram feitas em Termociclador Mastercycler Personal (Eppendorf) nas

seguintes condições: 5 min a 94°C, 40 ciclos de 45 s a 94°C, 45 s a 55°C e 45 s a 72°C, a 5 min a 72°C (Moura et al., 2012). As seguintes cepas foram utilizadas como controle positivo: *S.aureus* ATCC 14458 (*seb*) e ATCC 27664 (*see*).

### **3.4.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para detecção do gene da enterotoxina C (*sec*)**

As reações foram realizadas segundo Moura et al. (2012). As amostras foram testadas para a presença do gene da enterotoxina C (*sec*) o par de oligonucleotídeos iniciadores demonstrados na tabela 1. As reações da PCR foram otimizadas em 25 µL e continham 3 mM MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen), 5 pmol de cada *primer* (IDT), 1 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen), 1 x de tampão (Invitrogen), 300 µM de desoxirribonucleotídeos (ABgene) e água deionizada estéril (Milli Q plus, Millipore). As amplificações foram feitas em Termociclador Mastercycler Personal (Eppendorf) nas seguintes condições: 5 min a 94°C, 40 ciclos de 45 s a 94°C, 45 s a 55°C e 45 s a 72°C, a 5 min a 72°C (Moura et al., 2012). A seguinte cepa foi utilizada como controle positivo: *S.aureus* ATCC 19095 (*sec*).

TABELA 1. Sequências de oligonucleotídeos e temperaturas de anelamento para a amplificação de genes das enterotoxinas em *S.aureus* utilizados no estudo.

Gene	Primer	Sequência de oligonucleotídeos (5'-3')	Temperatura de anelamento	Tamanho do fragmento	Referências
<i>sea</i> <sup>a</sup>	-SEA	CCT TTG GAA ACG GTT AAA ACG	54 °C	126 pb	Moura et al., 2012
	-SEA	CTG AAC CTT CCC ATC AAA AAC			
<i>seb</i> <sup>b</sup>	-SEB	GGT ACT CTA TAA GTG CCT GC	55 °C	475 pb	Moura et al., 2012
	-SEB	TTC GCA TCA AAC TGA CAA ACG			
<i>sec</i> <sup>c</sup>	-SEC	AGA ACT AGA CAT AAA AGC TAGG	55 °C	267 pb	Moura et al., 2012
	-SEC	TCA AAA TCG GAT TAA CA T TAT CC			
<i>sed</i> <sup>d</sup>	-SED	TTT GGT AAT ATC TCC TTT AAA CG	55°C	309 pb	Moura et al., 2012
	-SED	CTA TAT CTT ATA GGG TA A ACA TC			
<i>see</i> <sup>e</sup>	-SEE	CCT ATA GAT AAA GTT AAA ACA AGC	55°C	173 pb	Moura et al., 2012
	-SEE	TAA CTT ACC GTG GAC CC TTC			

Controles positivos *S. aureus*: <sup>a</sup>ATCC 13565; <sup>b</sup>ATCC 14458; <sup>c</sup>ATCC 19095; <sup>d</sup>ATCC 23235; <sup>e</sup>ATCC 27664.

### 3.5. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para detecção dos genes *icaA*, *atIA* e *sasG*

As reações foram realizadas segundo Reiter et al. (2012). As amostras foram testadas para a presença dos genes *icaA*, *atIA* e *sasG* utilizando os pares de oligonucleotídeos iniciadores demonstrados na tabela 2. As PCRs foram otimizadas em 25 µL e continham 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen),



10 pmol de cada *primer* (IDT), 1 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen), 1 x de tampão (Invitrogen), 300  $\mu$ M de desorriboxinucleotídeos (ABgene) e água deionizada estéril (Milli Q plus, Millipore). As amplificações foram realizadas em Termociclador Mastercycler Personal (Eppendorf) nas seguintes condições: 5 min a 94°C, 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 54°C e 1 min a 72°C, a 5 min a 72°C.

TABELA 2. Sequências de oligonucleotídeos, tamanho do fragmento amplificado e temperaturas de anelamento e para a amplificação de genes *icaA*, *atlA* e *sasG* em *S. aureus* utilizados no estudo.

Gene	Primer	Sequência de oligonucleotídeos (5'-3')	Temperatura de anelamento	Tamanho do fragmento	Referências
<i>icaA</i>	<i>icaA</i> -F	AAACTTGGTGCGGTTACAGG	54 °C	188 pb	Reiter et al., 2012
	<i>icaA</i> -R	GTAGCCAACGTCGACAACTG			
<i>atlA</i>	<i>atlA</i> -F	CAGTTAGCAAGATTGCTCAAG	54 °C	1035 pb	Reiter et al., 2012
	<i>atlA</i> -R	CCGTTACCTGTTTCTAATAGG			
<i>sasG</i>	<i>sasG</i> -F	ACCACAGGGTGTAGAAGCTAAATC	54 °C	188 pb	Reiter et al., 2012
	<i>sasG</i> -R	CGAGC TTTTCTAA CCTTAGGTGTC			

### 3.6 A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para amplificar fragmento do gene *mecA*.

A detecção do gene *mecA* foi realizada utilizando os oligonucleotídeos iniciadores *mecA*<sup>1</sup> (TGGCTATCGTGTCACAATCG) *mecA*<sup>2</sup> (CTGGAACTTGAGCAGAG), segundo Vanuffel et al. (1998). As PCRs foram

otimizadas em 25 µL e continham 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen), 10 pmol de cada *primer* (IDT), 1 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen), 1 x de tampão (Invitrogen), 200 µM de desorriboxinucleotídeos (ABgene) e água deionizada estéril (Milli Q plus, Millipore). As amplificações foram realizadas em Termociclador Mastercycler Personal (Eppendorf) nas seguintes condições: 5 min a 94°C, 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 54°C e 1 min a 72°C, a 5 min a 72°C. O fragmento de DNA amplificado apresentando 310pb foi revelado após a eletroforese em gel de agarose.

### **3.7 Eletroforese em gel de agarose**

Os produtos de amplificação por PCR foram analisados por eletroforese em tampão TAE pH 8,0 (40 mM Tris-HCl, 20 mM acetato de sódio, 1 mM EDTA) em gel de agarose 1,5 % (Invitrogen) corado com brometo de etídio [0,5 µg/mL (Promega)], comparando-se com marcador molecular de 100 pb (Invitrogen).

### **3.8 Detecção do polimorfismo do *locus agr***

#### **3.8.1 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para amplificar fragmento do *locus agr*.**

O fragmento do *locus agr* foi amplificado utilizando o seguinte par de oligonucleotídeos iniciadores: AGR-F (AACTTAGATCATATTCAATTTTTGC) e AGR-R (AGACATTGTCTGCATTATCAGC) que amplificou um fragmento de DNA de 1889 pb, contendo os genes *agrB*, *agrD*, *agrC*. Oligonucleotídeos iniciadores foram desenhados utilizando as sequências dos grupos *agr* I, II, III e IV, respectivamente, publicadas com os números de acessos: X52543, AF001782, AF001783 e AF288215, no banco de dados do GenBank (*National*

Center for Biotechnology Information) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), buscando-se a região conservada do *locus agr*, que é comum aos quatro grupos.

Os oligonucleotídeos iniciadores foram testados na sequência do *locus agr* com o programa Primer3 (*National Institutes of Health National Human Genome Research Institute* [[www.genome.wi.mit.edu/genome\\_software/other/primer3.html](http://www.genome.wi.mit.edu/genome_software/other/primer3.html)]).

As reações da PCR foram otimizadas em 25 µL e continham 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen), 10 pmol de cada primer (IDT), 1 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen), 1 x de tampão (Invitrogen), 200 µM de desoxinucleotídeos (ABgene) e água deionizada estéril (Milli Q plus, Millipore). As reações foram amplificadas em Termociclador Mastercycler Personal (Eppendorf) nas seguintes condições: 5 min a 94 °C; seguido por 35 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min e 30 s a 60 °C e 1 min e 30 s a 72 °C; e 10 min a 72 °C. Os fragmentos de DNA foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio, e então visualizados sob luz UV.

### **3.8.2 Detecção do Perfil de Polimorfismo por Restrição Enzimática (RFLP) do *locus agr***

Após a amplificação do fragmento do *locus agr*, os diferentes produtos de PCR foram digeridos com a endonuclease de restrição *ScaI* (New England Biolabs), conforme descrito por Cafiso et al. (2007). A enzima *ScaI* reconhece seu sítio de restrição em uma das fitas de DNA e faz uma clivagem com extremidades cegas entre os nucleotídeos 5'...AGT▼ACT...3' e 3'...TCA▲TGA...5'. A enzima reconhece um sítio de clivagem na sequência do

*locus agr* nos polimorfismos I, II e III. No polimorfismo IV, este sítio de clivagem não está presente e, portanto, a enzima não efetua o corte.

A clivagem dentro da região polimórfica do *locus agr* resulta em diferentes produtos de digestão relacionados a cada polimorfismo. Aproximadamente 1 µg do produto da PCR foi digerido com 10 U da enzima *Scal* e 1X tampão *Scal* em uma reação de 25 µL, a 37 °C por 18 h. Os produtos de restrição foram visualizados em gel de agarose a 1% e corado com brometo de etídio (0,5 µg/mL).

### **3.9 Sequenciamento do *locus agr***

Um isolado de cada grupo I, II e III, e todos os isolados que apresentaram o perfil IV do polimorfismo *agr* pela técnica de RFLP foram submetidos à análise em sequenciador modelo ABI 3130 (Applied Biosystems) utilizando o polímero POP6. Para a marcação foi utilizado o kit *Big Dye Terminator* v3.1 (Applied Biosystems). Os dados das sequências foram analisados utilizando software CHROMAS (Technelysium Pty Ltd). As sequências de nucleotídeos foram analisadas pela ferramenta *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e alinhadas com as sequências depositadas no GenBank (*National Center for Biotechnology Information*) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>): X52543, AF001782, AF001783 e AF288215.

### **3.10 Detecção da formação de biofilme pelo teste da microplaca**

A determinação semiquantitativa de produção de biofilme foi desenvolvida usando o ensaio da microplaca como descrito previamente por Stepanovic et al. (2007). Os experimentos foram realizados em oituplicata.

Resumidamente, numa microplaca de poliestireno de fundo chato (COSTAR 3599, Corning, NY, USA), contendo 96 poços (12x8), foi adicionado no primeiro dia, em cada poço 20 µl de suspensão bacteriana (0,5 McFarland) com 180 µl de meio caldo triptona de soja (TSB) (Oxoid, Basingstoke, UK) suplementado com 1% de glicose. A placa ficou incubada durante 18 h a 35°C. Após este período, realizaram-se três lavagens com 200 µl de salina estéril para a remoção das células bacterianas não aderidas a superfície polimérica da placa. As células bacterianas aderidas foram fixadas com 150 µl de metanol por 20 minutos. Após este período a placa foi invertida e submetida à secagem por 30 minutos à temperatura ambiente. Foi adicionado cristal violeta 0,5% durante 15 minutos para corar as células bacterianas aderidas à placa. Depois, as placas foram lavadas em água corrente, e, após sua secagem à temperatura ambiente, o biofilme corado foi eluído com 150 µl de etanol por 30 min. A absorbância foi medida em 450nm em um leitor de ELISA (Behring EL 311-HOECHST, Akasaka, Japan). Cada placa conteve *S. epidermidis* ATCC 35984 como controle positivo e como branco foi utilizado apenas meio TSB sem bactéria. Os valores obtidos, assim como os desvios padrões foram calculados segundo Stepanovic et al. (2007). O valor da densidade óptica (DO) utilizado foi o valor médio obtido nas oito leituras para cada isolado menos o valor medido para o controle branco; desta forma foi possível excluir os valores mais discrepantes e controlar a variabilidade. Considera-se produtor de biofilme as amostras, cuja média de leitura DO para cada isolado, foi maior ao valor do ponto de corte (DOc), definido pela seguinte fórmula  $[B + 3(s)]$  (STEPANOVIC et al., 2007), onde B é a média da leitura do branco e s é o desvio padrão das

leituras do branco. Os isolados foram classificados como fortes produtores de biofilme quando  $4DOc \leq DO$ , moderado quando  $2DOc \leq DO \leq 4DOc$  e fraco quando  $DOc \leq DO \leq 2DOc$  e não produtor de biofilme quando valor obtido foi igual ou menor ao valor de  $DOc$ .

### **3.11 Testes de suscetibilidade aos antimicrobianos**

#### **3.11.1 Teste por disco-difusão**

A suscetibilidade aos antimicrobianos foi testada através do método de disco-difusão em ágar (Bauer et al., 1966,) de acordo com o CLSI (CLSI, 2013). Foram testados os seguintes antimicrobianos (NewProv): penicilina 10 U, cefoxitina 30  $\mu$ g, gentamicina 10  $\mu$ g, clindamicina 2  $\mu$ g, rifampicina 5  $\mu$ g, cloranfenicol 30  $\mu$ g, eritromicina 15  $\mu$ g, tetraciclina 30  $\mu$ g, levofloxacino 5  $\mu$ g. As placas de Ágar Müller-Hinton (Himedia) foram semeadas com culturas diluídas a 0,5 na escala McFarland e incubadas a 35°C por 18h com os discos de antimicrobiano, com exceção do disco de cefoxitina que permaneceu incubado por 24h. Após este período, os halos de inibição foram medidos e interpretados pelas normas do CSLI (2013). A cepa *S.aureus* ATCC 25923 foi utilizada como controle. Isolados com resistência a pelo menos três classes de antimicrobianos foram considerados multirresistentes. Isolados que apresentaram perfis de suscetibilidade com pelo menos uma diferença a qualquer antimicrobiano foram considerados perfis com diferentes vias de suscetibilidade diferentes, cada perfil foi representado por uma letra.

### **3.11.2 Suscetibilidade a oxacilina, vancomicina e teicoplanina pela técnica de microdiluição em caldo**

A determinação dos valores de concentração inibitória mínima (CIM) para oxacilina, vancomicina e teicoplanina foi desenvolvida conforme as recomendações do CLSI (2009) em microplacas de poliestireno de 96 poços de fundo chato (Costar nº 3596; Corning Inc., Corning, NY, USA). Para isto, os isolados foram inoculados em caldo Müller-Hinton contendo concentrações de 512 µg de oxacilina/mL, 8 µg de vancomicina/mL e 8 µg de teicoplanina/mL, e seguintes diluições 1:1 em microplaca de 96 poços. Valores intermediários as diluições 1:1 também foram testados para os glicopeptídeos. A menor concentração em que não houve crescimento foi considerada a Concentração Inibitória Mínima (CIM). A cepa *S. aureus* ATCC® 29213 e *E. faecalis* ATCC® 29212 foram utilizadas como controle.

### **3.12 Ensaio de expressão da δ-hemolisina**

A expressão do operon *agr* foi avaliada através da produção da δ-hemolisina. A produção da δ-hemolisina foi determinada utilizando a cepa de *S.aureus* RN4420, que produz uma zona larga de β-hemólise sem a interferência da α e δ-hemolisina. A β e a δ-hemolisina atuam sinergicamente lisando as células de sangue de carneiro. Isolados que produzem a δ-hemolisina formam uma zona em forma de ponta de seta na placa de Agar sangue, devido à sobreposição da δ-hemolisina produzida pelo isolado com a β-hemolisina produzida pela cepa *S.aureus* RN4220 (Coelho et al., 2008; Adhikari et al., 2007; Janzon & Arvidson, 1990).

Para o desenvolvimento do ensaio, a cepa RN4220 de *S. aureus* foi gentilmente cedida pela Doutora Agnes Figueiredo da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil. Uma cultura nova da cepa RN4220, crescida à temperatura de 37°C por 18 h em ágar triptona de soja (TSA) (HIMEDIA), foi semeada no centro da placa de Agar sangue de carneiro. Os isolados testes, também crescidos em TSA, foram inoculados perpendicularmente à cepa RN4220, em cada metade da placa. A placa foi incubada a 37°C por 18 h e examinada a zona hemolítica circundante ao crescimento bacteriano.

### **3.13 Análise molecular através do REP-PCR**

A tipagem pela técnica de REP-PCR foi desenvolvida conforme descrita por Santos et al. (2001) com algumas modificações. A concentração de DNA das amostras foi determinada por espectrofotometria a 260 nm com equipamento BioSpec-nano (Shimadzu) e ajustada com tampão TE-1X (Tris 10 mM, EDTA 1 mM – pH 7,8) para 100 ng/μL.

Perfis genéticos foram gerados utilizando os oligonucleotídeos iniciadores RW3A (TCGCTAAAACAACGACACC) da sequência repetitiva RepMP3 do *M. pneumoniae* (Wenzel & Herrmann, 1988). As reações da PCR foram otimizadas em 25 μL e continham 3 mM MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen), 37,5 pmol primer, 1,25 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen), 1 x de tampão (Invitrogen), 250 μM de desoxinucleotídeos (ABgene), 100 ng de DNA e água deionizada estéril (Milli Q plus, Millipore). As reações foram amplificadas no Termociclador Amplitherm Thermal Cyclers, nas seguintes condições: 3 min a 95 °C; seguido por 40 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min e 30 s a 54 °C e 2 min a 72 °C; e 10 min a



72 °C. Os produtos de PCR foram submetidos à eletrofores em gel de agarose a 2% e corado com brometo de etídio. Os perfis de bandas gerados pelo REP-PCR foram analisados com o software Gel-Pro Analyzer 32 após a normalização com marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen).

Para assegurar a acurácia do método de PCR, cada isolado foi tipado pelo menos duas vezes. Isolados com diferença de um ou mais fragmentos de bandas foram considerados diferentes clones.

### **3.13.1 Análise dos resultados de tipagem dos isolados**

A análise de similaridade entre os isolados de *S.aureus* foi baseada na presença ou ausência de bandas específicas na análise do REP-PCR. A matriz de similaridade foi obtida por meio de comparações entre pares de cepas utilizando o coeficiente de similaridade de Dice. Para essas análises, o pacote de software PAST (Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis) foi utilizado. Um dendrograma foi construído usando o método de *un weighted pair group* com média aritmética (UPGMA).

### **3.14 Análise estatística**

Todos os teste estatísticos foram desenvolvidos com o programa Portable Statistica 8.exe. Teste *t* de Student foi utilizado para variáveis contínuas, como para comparar médias dos valores de biofilme. Foi considerado significativo quando  $P < 0,05$ . Para variáveis categóricas foi utilizado o teste exato de Fisher com duas caudas e um valor de  $P < 0,05$  foi considerado significante.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Isolados bacterianos

Trinta e quatro isolados de CVC e vinte e nove isolados de carne de frango foram identificados como *S.aureus* fenotipicamente, através dos testes de coloração de Gram, catalase, coagulase e fermentação do manitol, e genotipicamente através da amplificação do fragmento do gene *nuc* pela técnica de PCR (Figura 4). A identificação genotípica foi concordante com os testes de caracterização fenotípica realizados.

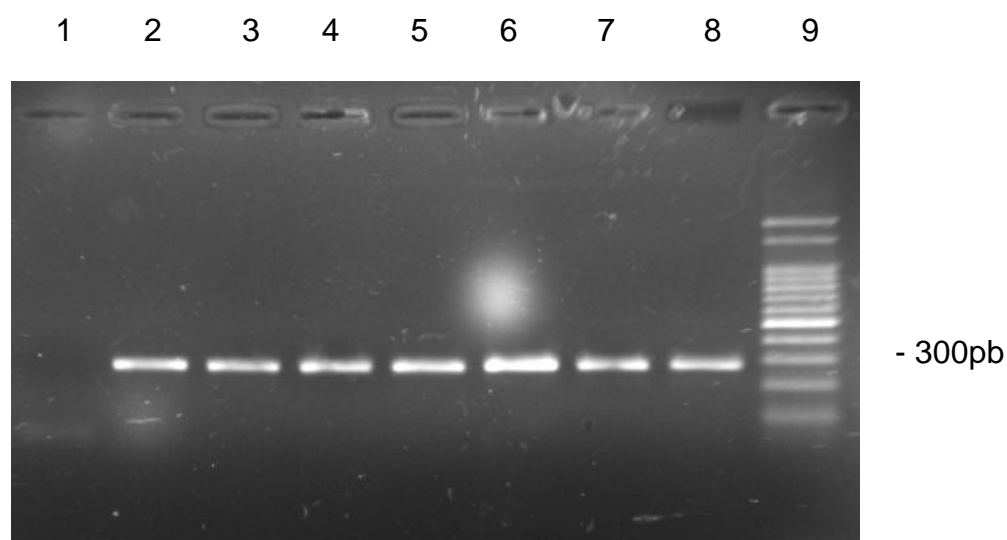


FIGURA 4. Eletroforese em gel de agarose 1,5 % dos produtos de amplificação do gene *nuc* em *Staphylococcus aureus*. Linha 1: controle negativo, Linha 2: controle positivo: *S.aureus* ATCC 25923; Linha 3 à 8: isolados positivos para o gene *nuc*; Linha 9: Marcador de peso molecular 100 pb

#### 4.2 Detecção das enterotoxinas estafilocócicas

Em 47,06% (16/34) e 31,03% (9/29) dos isolados de CVC e carne de frango, respectivamente, foram encontrados pelo menos um dos genes das enterotoxinas. Os genes *sed* e *see* não foram detectados em nenhum isolado. O gene *sea* foi o mais prevalente, em 44,11% (15/34) dos isolados de CVC e 31,03% (9/29) dos isolados de carne de frango. Os genes *seb* e *sec* estiveram presentes somente entre os isolados de CVC, em 5,88% (2/34) e 8,82% (3/34) dos isolados respectivamente (Tabela 3). Quatro isolados de CVC apresentaram mais de um gene concomitantemente: três isolados portavam os genes *sea* e *sec* e um isolado os genes *sea* e *seb*.

Embora tenha sido detectado maior percentual de cepas enterotoxigênicas em isolados de CVC comparado aos isolados de frangos, a diferença não foi estatisticamente significativa ( $P>0.05$ ).

TABELA 3. Prevalência dos genes das enterotoxinas estafilocócicas clássicas entre isolados de *S.aureus* de CVC e carnes de frango.

Isolados (n) <sup>1</sup>	Percentual de isolados positivos para as enterotoxinas detectados por PCR					Percentual de isolados negativos para as enterotoxinas detectados por PCR
	<i>sea</i>	<i>seb</i>	<i>sec</i>	<i>sed</i>	<i>see</i>	
CVC (34)	44,11	5,88	8,82	0	0	52,94
CF (29)	31,03	0	0	0	0	68,97

1. CVC: cateter venosos central, CF: carne de frango;

### 4.3 Suscetibilidade aos antimicrobianos

O perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos foi avaliado utilizando antimicrobianos comumente utilizados na prática clínica (Tabela 4). Dois isolados de CVC (5,9%) foram susceptíveis a todos os antimicrobianos testados. Nos isolados de carne de frango, 13,79% (4/29) foram sensíveis a todos os antimicrobianos, de acordo com CLSI (CLSI, 2013).

As maiores taxas de resistência encontrada, para ambos os grupos, foi para a penicilina, com 88,23% (30/34) e 86,20% (25/29), em isolados de CVC e carne de frango, respectivamente. Sendo que, em 61,76% (21/34) e 86,20% (25/29) dos isolados, respectivamente, a única resistência encontrada foi para a penicilina sendo suscetível aos demais antimicrobianos. Isolados multirresistentes foram encontrados apenas nos isolados de CVC em 17,64% (6/34).

Em isolados de carne de frango, nenhum isolado foi resistente a oxacilina, cloranfenicol, eritromicina, tetraciclina, clindamicina, gentamicina, levofloxacino e rifampicina. Conforme tabela 4. Já em isolados de CVC, resistência a oxacilina foi de 17,6% (6/34), cloranfenicol 5,9% (2/34), 17,6% (6/34) para eritromicina, 5,9% (2/34) para tetraciclina, 17,6% (6/34) para clindamicina, 17,6% (6/34) para gentamicina, 8,8% (3/34) para levofloxacino, 5,9% (2/34) para rifampicina.

TABELA 4. Perfil de resistência dos *S.aureus* isolados de CVC e carne de frango.

Antimicrobianos testados <sup>1</sup>	Percentual de isolados resistentes <sup>2</sup>	
	CVC	CF
PEN	88,23 (30/34)	86,20 (25/29)
CEF	17,65 (6/34)	0
CLO	5,88 (2/34)	0
ERI	17,65 (6/34)	0
TET	5,88 (2/34)	0
CLI	17,65 (6/34)	0
GEN	17,65 (6/34)	0
LEV	8,82 (3/34)	0
RIF	5,88 (2/34)	0

1. N: penicilina 10 UI; CEF: cefoxitina 30 µg; CLO: cloranfenicol 30 µg; ERI: eritromicina 15 µg; TET: tetraciclina 30 µg; CLI: clindamicina 2 µg; GEN: gentamicina 10µg; LEV: levofloxacino 5 µg; RIF: rifampicina 5 µg.

2. CVC: cateter venosos central, CF: carne de frango;.

A resistência a oxacilina detectada pela técnica de disco-difusão e pela CIM foi confirmada, através da detecção do gene *mecA*, pela técnica de PCR. De acordo com o resultado deste trabalho, 17,6% (6/34) dos isolados de CVC foram MRSA. Nenhum isolado de carne de frango foi resistente a oxacilina.

Para a determinação do valor da CIM para os antimicrobianos: vancomicina, teicoplanina e oxacilina, os isolados foram submetidos à técnica de microdiluição em caldo. Todos os isolados de carne de frango foram sensíveis a oxacilina. Seis isolados de CVC foram resistentes a oxacilina (Tabela 5). Todos os isolados de CVC e frangos testados foram sensíveis aos glicopeptídeos, vancomicina e teicoplanina. Os valores de CIM para

vancomicina ficaram entre 0,5-1µg/mL (Tabela 6) e para teicoplanina, entre 0,25-1 µg/mL (Tabela 7).

TABELA 5. Distribuição das CIMs para oxacilina em *S.aureus* isolados de carne de frangos e CVC.

Isolados (n)	Nº (%) de isolados para os quais a CIM (µg/mL) da oxacilina foi:						
	0,125	0,25	0,5	1	128	256	>256
CF (29)	0	3 (10,34)	4 (13,79)	23 (79,31)	0	0	0
CVC (34)	0	7 (20,59)	2 (5,88)	15 (44,12)	2 (5,88)	3 (8,82)	1 (2,94)

1. CF: carne de frango; CVC: cateter venosos central.

TABELA 6. Distribuição das CIMs para vancomicina em *S.aureus* isolados de carne de frangos e CVC.

Isolados (n) <sup>1</sup>	Nº (%) de isolados para os quais a CIM (µg/mL) da vancomicina foi:				
	0,125	0,25	0,5	0,75	1
CF (29)	0	0	3 (10,34)	17 (58,62)	9 (31,04)
CVC (34)	0	0	16 (47,05)	18 (52,95)	0

1. CF: carne de frango; CVC: cateter venosos central.

TABELA 7. Distribuição das CIMs para teicoplanina em *S.aureus* isolados de carne de frangos e CVC

Isolados (n) <sup>1</sup>	Nº (%) de isolados para os quais a CIM (µg/mL) da teicoplanina foi:				
	0,125	0,25	0,5	0,75	1
CF (29)	0	1 (3,45)	6 (20,69)	19 (65,52)	3 (10,35)
CVC (34)	0	17 (50)	15 (44,12)	2 (5,88)	0

1. CF: carne de frango; CVC: cateter venosos central.

Os isolados de CVC e de carne de frangos apresentaram oito perfis de suscetibilidade, representado pelas letras: a, b, c, d, e, f, g e h, conforme

tabela 13. O perfil a, que correspondeu a isolados com resistência apenas a penicilina, foi encontrado em 71,42% (45/63) dos isolados, presente em 58,82% (20/34) dos isolados de CVC e 86,20 % (25/29) dos isolados de carne de frangos. Seis isolados (9,52%) tiveram o perfil g e foram sensíveis a todos os antimicrobianos testados. O perfil b, c e d foram presentes em apenas dois (3,17%) isolados de CVC. O perfil b foi sensível ao cloranfenicol, tetraciclina e levofloxacino. O perfil c foi sensível à tetraciclina e rifampicina. O perfil d foi intermediário apenas a eritromicina e sensível aos demais. Três isolados (4,76%) de CVC tiveram o perfil e, sendo resistente à penicilina e tetraciclina. Um isolado (1,58%) de CVC apresentou o perfil f, sendo sensível apenas ao cloranfenicol, tetraciclina e rifampicina. O perfil h foi presente em um isolado (1,58%) de CVC que apresentou sensibilidade apenas ao cloranfenicol e tetraciclina e intermediário a levofloxacino.

#### **4.4 Determinação da produção de biofilme**

Deteção fenotípica da formação de biofilme nos isolados de *S.aureus* de CVC e carne de frango foi avaliada através do ensaio semiquantitativo em microplaca. No grupo dos isolados de CVC, apenas dois (5,88%) isolados apresentaram capacidade de formar biofilme, um foi classificado como fraco e o outro moderado formador. Nos isolados de carne de frango, 93% (27/29) formaram biofilme, oito moderados e 19 fortes formadores (Tabela 8). Houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos de CVC e carne de frango quanto à capacidade de formação de biofilme ( $P < 0,01$ ) (Figura 5).

TABELA 8. Classificação quanto à capacidade de formação de biofilme em *S.aureus* isolados de cateter venoso central e carne de frango.

Capacidade de formação de biofilme	CF <sup>1</sup> (%)	CVC <sup>1</sup> (%)
<b>Não formadores</b>	2/29 (6,9)	32/34 (94,12)
<b>Fracos</b>	0	1/34 (2,94)
<b>Moderados</b>	8/29 (27,59)	1/34 (2,94)
<b>Fortes</b>	19/29 (65,52)	0

1. CF: carne de frango; CVC: cateter venosos central.

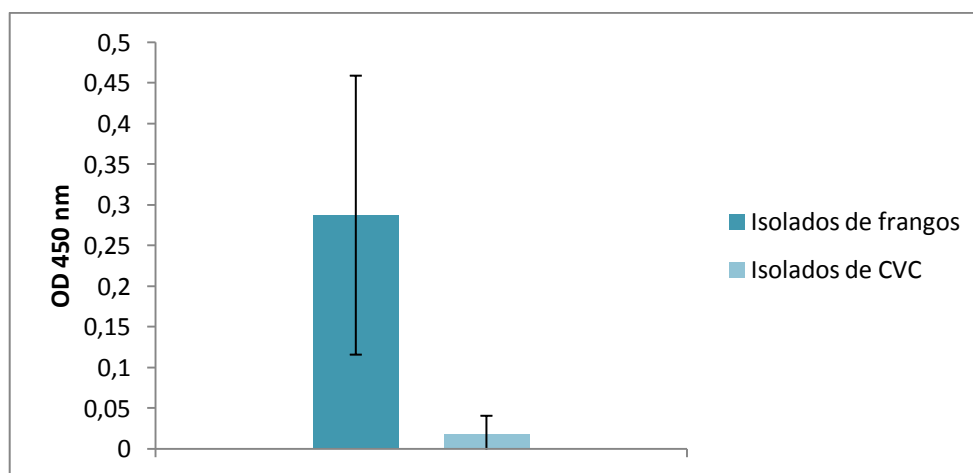


FIGURA 5. Gráfico em barra demonstrando a média dos valores de densidade óptica na formação de biofilme em *S.aureus* isolados de cateter venoso central e carne de frango ( $P < 0,01$ ).



#### 4.5 Polimorfismo do *locus agr*

O polimorfismo de todos os isolados foi determinado pelo método de RFLP utilizando a enzima *ScaI*. A presença de um único sítio de restrição para cada genótipo *agr* permitiu nos obter quatro perfis de restrição diferentes. O perfil de restrição enzimática do operon *agr* dos isolados está demonstrado na Figura 6. Os produtos amplificados, referentes a cada polimorfismo *Agr*, de quatro isolados selecionados, usados como controle, foram sequenciados e comparados com aqueles depositados no GenBank.

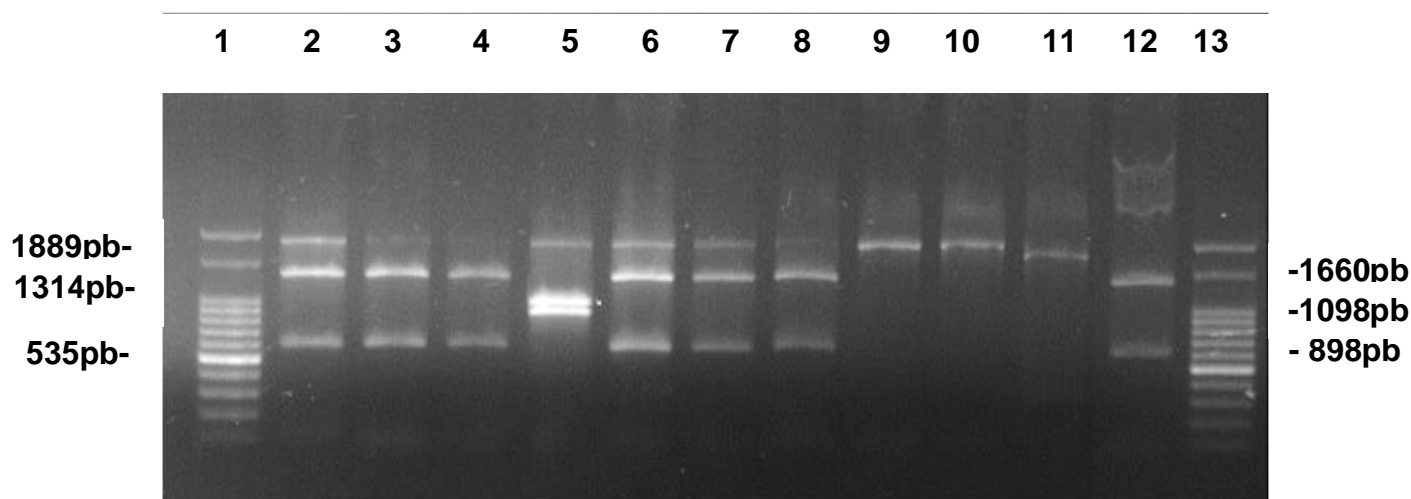


FIGURA 6. Digestão dos produtos de amplificação do lócus *agr* com enzima de restrição *ScaI* em isolados de *S. aureus*. Linhas 1 e 13: Marcador de peso molecular 100 pb Ladder; Linha 2, 3, 4, 6, 7, 8 e 12: polimorfismo I: banda de 585 e 1314pb; Linha 5: polimorfismo II: banda de 898 e 1098pb; Linha 9 e 10: sem digestão pela técnica de RFLP; Linha 11: polimorfismo III: banda de 1660pb.

Após digestão enzimática com *ScaI* foram observados quatro perfis (I ao IV) diferentes de restrição. Os perfis de restrição encontrados nos isolados de CVC e frangos estão demonstrados na Tabela 9.

Seis isolados que não foram clivados pela enzima *Scal* também foram sequenciados. Através do sequenciamento, foram detectadas mutações no sítio de reconhecimento da enzima. Destes seis isolados, dois tinham o polimorfismo I e quatro o polimorfismo III. Nenhum isolado de CVC e carne de frango apresentaram o polimorfismo IV.

No grupo dos isolados de carne de frango foi visto que o polimorfismo I foi mais detectado em comparação ao grupo de CVC ( $P < 0,01$ ). Já em isolados de CVC foi detectado maior predomínio do polimorfismo II em relação aos isolados de carne de frango ( $P < 0,05$ ).

TABELA 9. Perfis de restrição enzimática *locus agr* em *S.aureus*, de cateter venoso central e carne de frango clivados com a enzima *Scal*.

Perfil	Genótipo PCR-RFLP	% de isolados			P
		CVC	CF	%Total	
I	1314 pb- 585 pb	44,11	86,20	60,49	<0,01
II	1001 pb – 898 pb	38,23	10,34	25,39	<0,05
III	1660 pb- 239 pb	17,64	3,44	20,58	
IV	1889 pb	0	0	0	

pb: pares de bases, CVC: cateter venosos central; CF: carne de frango.

#### 4.6 Detecção da expressão da $\delta$ -hemolisina

Entre os isolados de CVC, foram encontrados 88,23% (30/34) de isolados produzindo a  $\delta$ -hemolisina, ou seja, expressavam o sistema Agr. Já

para isolados de carne de frango, apenas 3,44% produziram a  $\delta$ -hemolisina ( $P < 0,01$ ) (Tabela 10).

TABELA 10. Correlação entre a expressão da  $\delta$ -hemolisina e origem dos isolados de *S.aureus*.

Isolados (n°) <sup>1</sup>	Numero (%) de isolados x fenótipo da expressão da $\delta$ -hemolisina		
	Positivos	Negativos	P
CF (29)	1 (3,44%)	28 (96,56%)	<0,01
CVC (34)	30 (88,23%)	4 (11,77%)	<0,01

1. CF: carne de frango; CVC: cateter venosos central.

#### 4.7 Relação entre produção de biofilme e genótipo *agr*

No polimorfismo I, que representou 63,49% (40/63) dos isolados, 19 foram classificados como fortes, 6 moderados, 1 fraco e 14 não formadores. Já para o polimorfismo II, presente em 25% (16/63) dos isolados, 14 isolados não formaram biofilme e dois foram moderados. No polimorfismo III, que representou 11% (7/63) dos isolados, 6 eram não-formadores e 1 moderado formador de biofilme. Não houve relação entre o polimorfismo *agr* com o fenótipo de formação de biofilme para os isolados de CVC e carne de frango (Tabela 11).

TABELA 11. Relação entre polimorfismo *agr* e formação de biofilme em *S.aureus* isolados de CVC e carne de frango.

Polimorfismo <i>agr</i>	Biofilme	Número de isolados de	
		CVC	Carne de frango
I	Forte	-	19
	Moderado	-	6
	Fraco	1	-
	Não formador	14	-
II	Forte	-	-
	Moderado	-	2
	Fraco	-	-
	Não formador	13	1
III	Forte	-	-
	Moderado	1	-
	Fraco	-	-
	Não formador	5	1

#### 4.8 Prevalência dos genes envolvidos com a formação de biofilme entre os isolados de frangos e CVC de *S.aureus*

Nos isolados de CVC, os genes *icaA*, *atlA* e *sasG* envolvidos com a formação de biofilme estiveram presente em 100% (34/34), 97,05% (33/34) e 100% (34/34) dos isolados, respectivamente. Apenas um isolado de CVC não apresentou o gene *atlA*. Os genes *icaA*, *atlA* e *sasG* nos isolados de carne de frango foram detectados em 93,10% (27/29), 51,72% (15/29) e 100% (29/29), respectivamente.

#### 4.9 Relação entre formação de biofilme e expressão do *quorum sensing* Agr através da produção da $\delta$ -hemolisina.

A capacidade de formação de biofilme em isolados produtores da  $\delta$ -hemolisina foi de apenas 3,22% (1/31). Já a formação de biofilme, em isolados

que não produziram a  $\delta$ -hemolisina foi de 87,50% (28/32). Houve correlação negativa entre a expressão da  $\delta$ -hemolisina, ou seja, a expressão do *quorum sensing* Agr e formação de biofilme ( $P < 0,01$ ) (Tabela 12).

TABELA 12. Correlação negativa entre a funcionalidade do sistema Agr através da expressão da  $\delta$ -hemolisina e formação de biofilme em *S. aureus* isolados de CVC e carne de frango.

Isolados testados (n°)	% de formação de biofilme	
	Positivo	Negativo
$\delta$ -hemolisina positiva (31)	3,22	96,78
$\delta$ -hemolisina negativa (32)	87,50	12,50

Dados: (%).  $P < 0,01$ .

#### 4.10 Diversidade genética dos isolados

Análise da diversidade genética dos 63 isolados foi realizada através da comparação visual dos perfis de amplificação gerados pela técnica de REP-PCR. A amplificação dos isolados de *S.aureus* utilizando o primer RW3A revelou um total de 11 perfis de bandas no gel de agarose. O número de fragmentos de bandas variou entre 5 a 8 por isolado e os tamanhos entre 300 a 1900 pb (Figura 7). Para cada um dos padrões de amplificação gerados foi dado uma letra de A a L.

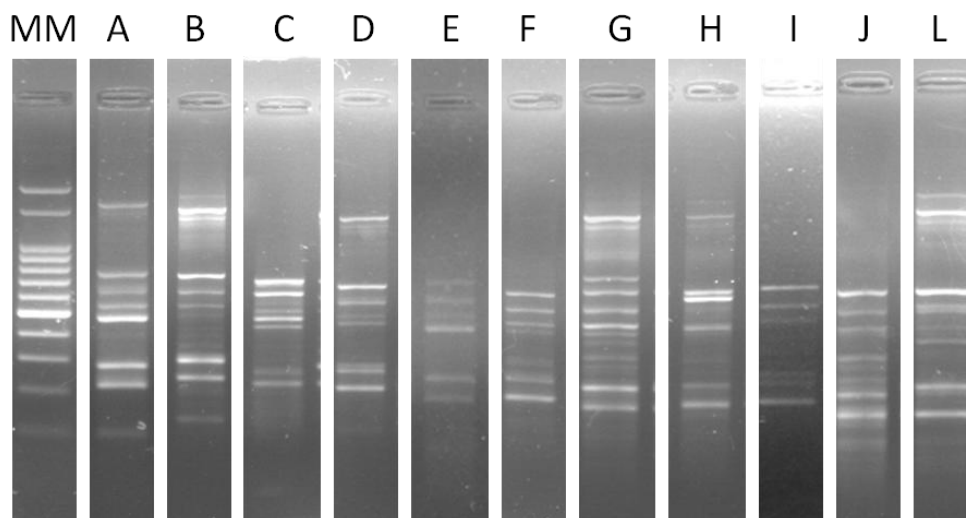


FIGURA 7. Os 11 perfis de bandas (A, B, C, D, E, F, G, H, I, J e L) dos isolados de *S.aureus* de CVC e carne de frango, gerados pelo REP-PCR (MM: marcador molecular de 100 pb).

Os perfis foram submetidos à análise de agrupamento para avaliar a diversidade genética dos isolados de *S.aureus* e explorar sua relação com as suas diferentes origens. Os dendogramas gerados estão nas figuras 8, 9 e 10.

Através do REP-PCR pode-se diferenciar o grupo dos isolados de CVC em dez clones (A, B, C, D, F, G, H, I, J e L) (Figura 9). Em isolados de carne frango houve a diferenciação em quatro clones (A, D, E e J) (Figura 10). O tipo A foi encontrado em 49,20% (31/63) e correspondeu a maioria dos isolados. O segundo maior tipo foi o J, com 15,87% (10/63), seguido do B com 12,70% (8/63). Tanto isolados de CVC quanto de frangos apresentaram os tipos A e J. Já o tipo B e C, foram presentes apenas em isolados de CVC (Figura 8).

Os tipos D, E, F, G, H, I e L foram encontrados em apenas 15,87% (10/63) dos isolados. O tipo D foi presente em quatro isolados, três de CVC e um de frango. O tipo E foi presente em apenas um isolado de frango e os tipos F, G, H, I e L em apenas um isolado de CVC cada (Figura 8).

No tipo A, houve predomínio dos isolados de carne de frango com 77,41% (24/31), dos isolados. O tipo C (5/63) foi o que teve menor similaridade, inferior a 48%, frente aos outros tipos (Figura 8).

No grupo dos isolados de frangos, foi possível verificar uma menor diversidade, com todos os isolados apresentando acima de 72% de similaridade entre si. Já entre isolados de CVC, o nível de dissimilaridade chegou a 40% (Figura 9).

Em oito agrupamentos, houve apenas isolados de frangos ou CVC. Nos outros três grupos gerados, tanto isolados de CVC quanto de frangos, estiveram presentes. Dentro destes três grupos, houve 28 (96,6%) isolados de carne de frangos que pareceram ser clones dos isolados de CVC. Já em isolados de CVC, 52,94% (18/34) foram clones também de isolados de carne de frango.

Quando analisado os grupos formados, determinando um ponto de corte de 88% de similaridade, os isolados foram divididos em seis grupos. No grupo I, 69,84% (44/63) dos isolados estiveram presentes, correspondendo a cinco clones. Dentro deste grupo, 17 dos isolados corresponderam a isolados de carne de frango e 27 a isolados de CVC (Figura 8).

Nos isolados de carne de frango, 93,10% (27/29) pertenceram ao grupo I, os demais isolados pertenceram ao grupo V, que teve 72% de

similaridade em relação ao grupo I. Em isolados de CVC, 50% (17/34) pertenceram ao grupo I, o restante dos isolados aos grupos II, III, IV, V e VI. Estes últimos grupos apresentaram abaixo de 48% de similaridade em relação aos isolados do grupo I (Figura 10).



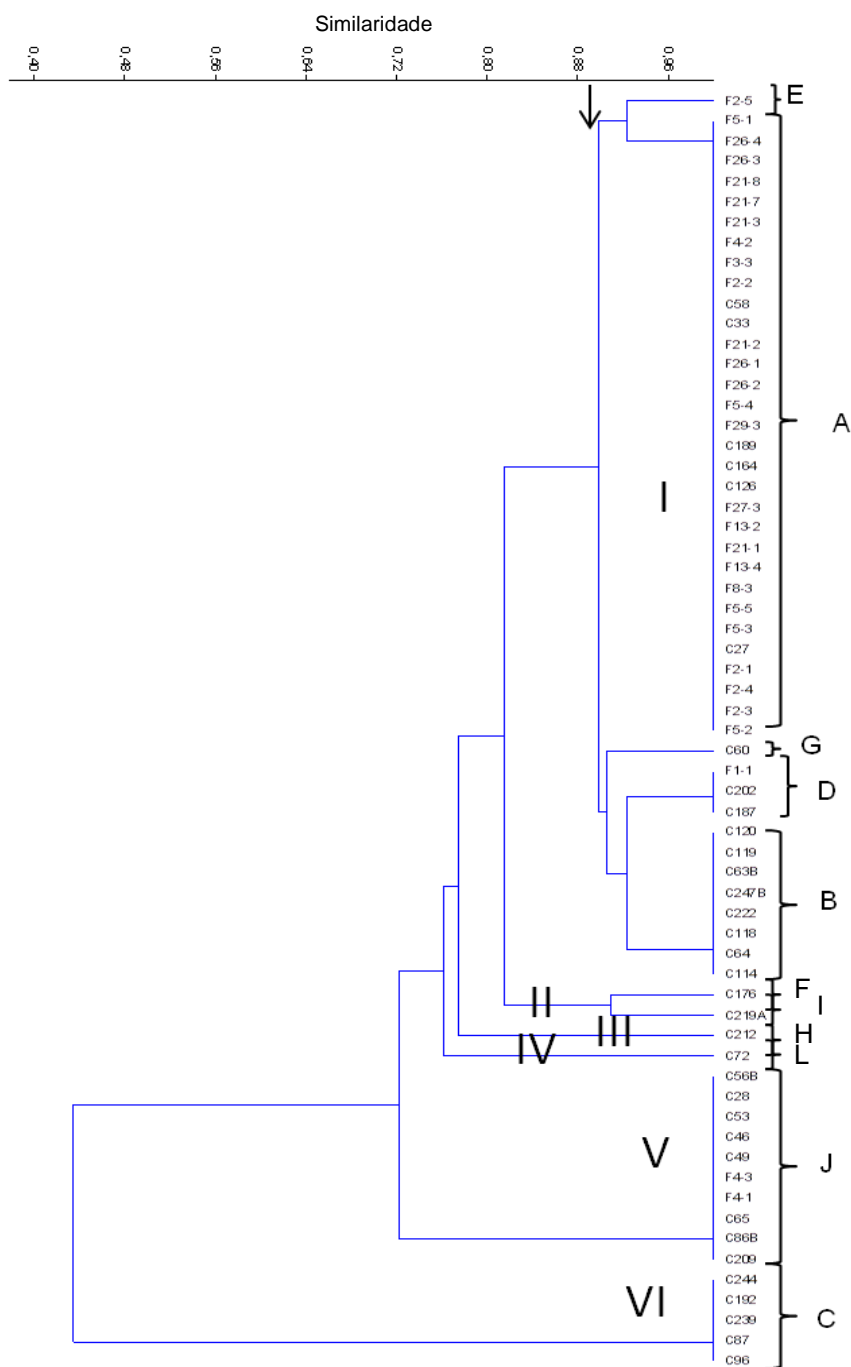


FIGURA 8. Dendrograma do REP-PCR dos 63 *S.aureus* isolados de frango (n=29) e CVC (n=34). Neste dendrograma, os isolados de carne de frango são marcados como F e isolados obtidos de CVC como C. Onze clones foram identificados (A, B, C, D, E, F, G, H, I, J e L). Avaliando os grupamentos formados com 88% de similaridade, seis grupamentos foram determinados (I, II, III, IV, V e VI).

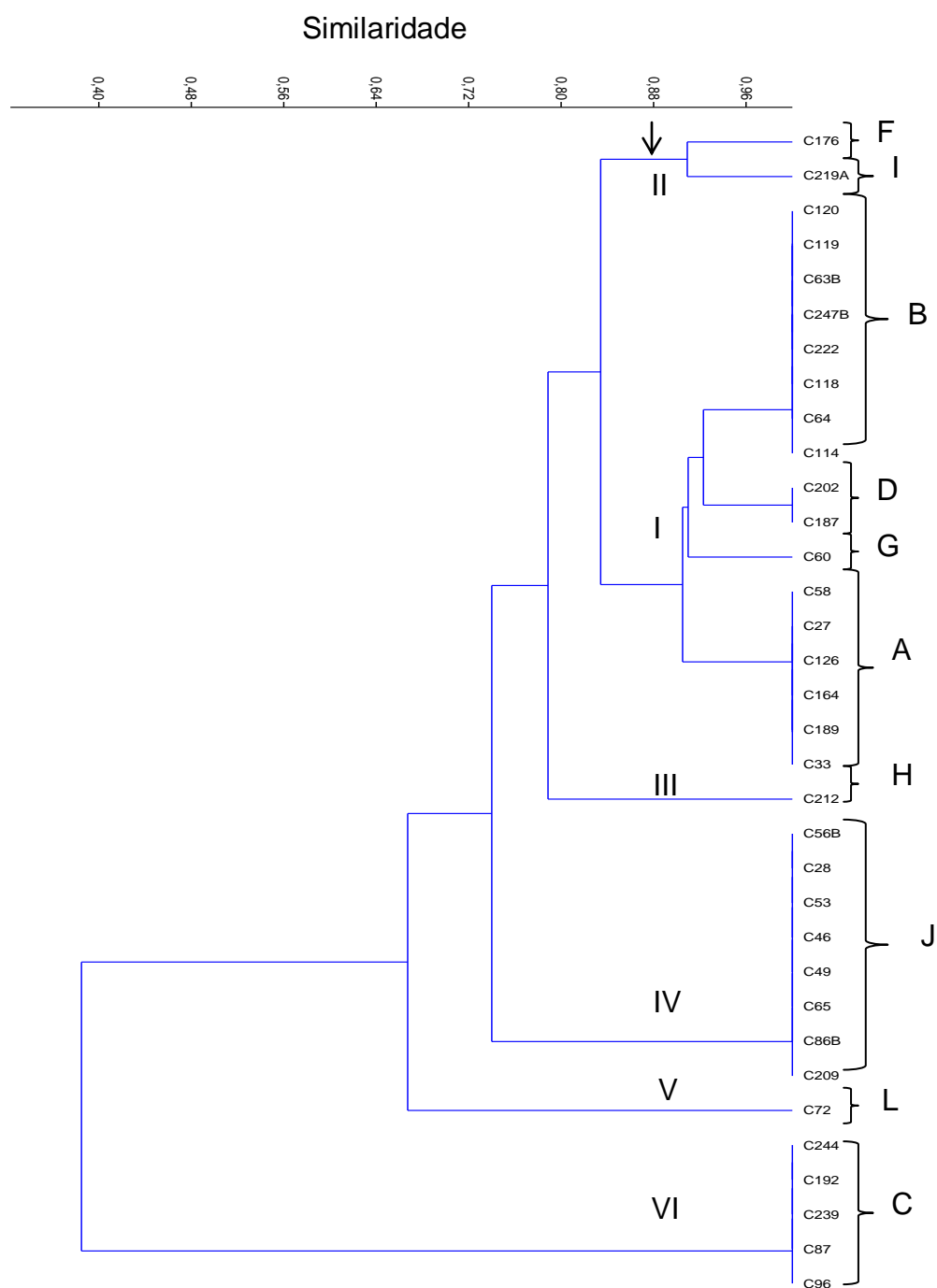


FIGURA 9. Dendrograma do REP-PCR dos 34 *S. aureus* isolados de CVC. Neste dendrograma, os isolados de CVC estão identificados como C. Dez clones foram identificados (A, B, C, D, F, G, H, I, J e L). Avaliando os grupamentos com 88% de similaridade, seis grupamentos foram determinados (I, II, III, IV, V e VI).

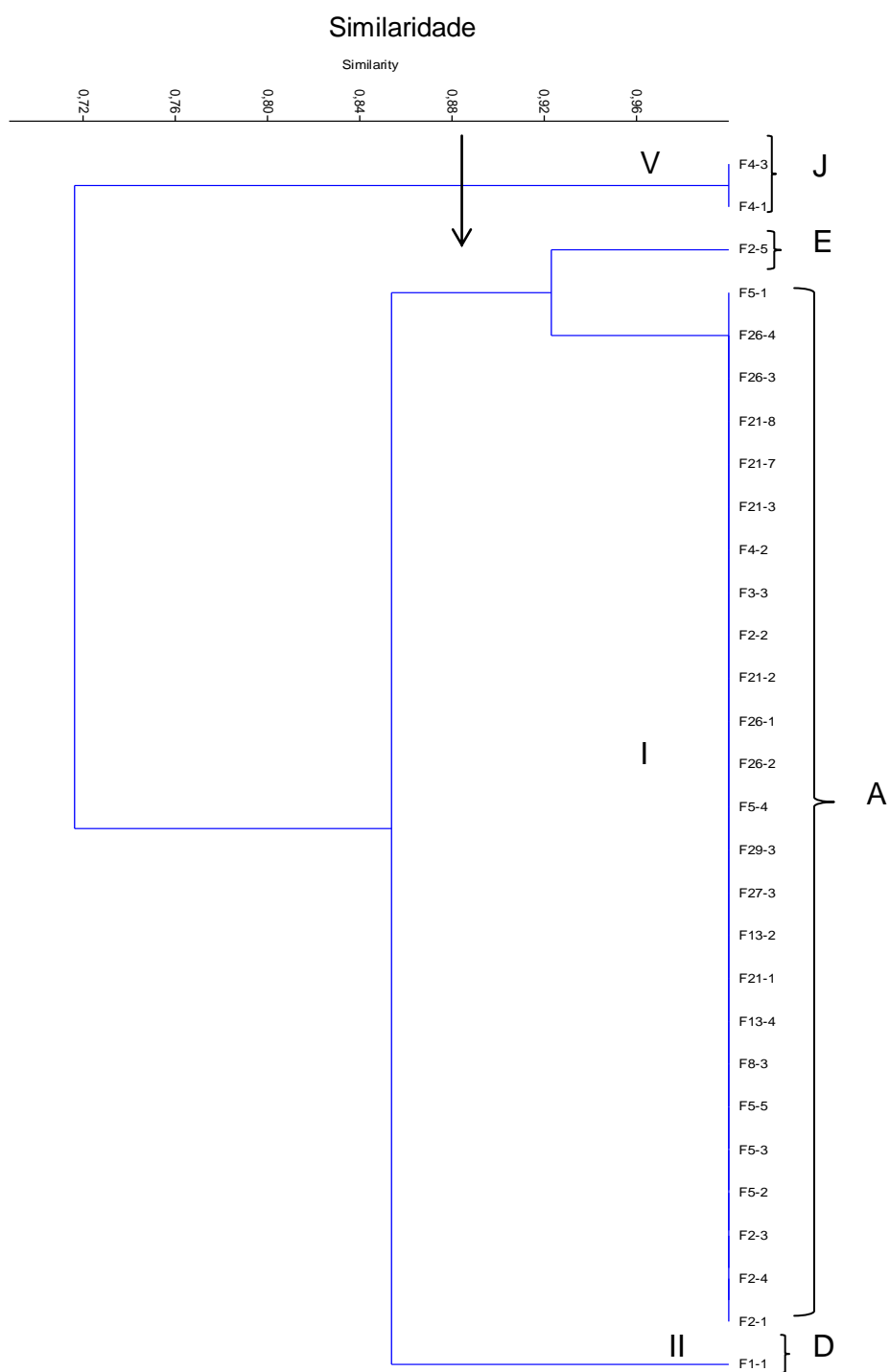


FIGURA 10. Dendograma do REP-PCR dos 29 *S.aureus* isolados de frango. Neste dendograma, os isolados de carne de frango estão identificados como F. Quatro clones foram identificados (A, D, E e J). Avaliando os grupamentos formados com 88% de similaridade, três grupamentos foram determinados (I, II e V).

#### **4.11 Relação entre a diversidade genética, polimorfismo *agr* e perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos**

A análise dos agrupamentos mostrou que os isolados foram divididos de acordo com os quatro grupos *agr* (Tabela 13). As cepas do grupo III foram mais individualizadas, enquanto que, cepas do grupo I e II foram parcialmente sobrepostas ao tipo III. Alguns isolados foram agrupados em determinados tipos pelo REP-PCR, porém discrepantes quanto ao perfil determinado do grupo *Agr* para estes tipos (três isolados do grupo *agr* I e dois isolados do grupo *agr* II).

Isolados com polimorfismo I foram presentes nos tipos A, B, C, D, E e L. Já o polimorfismo II foi encontrado nos tipos B, F, H, I e J, e o III, nos tipos C, D e G.

Os isolados apresentaram sete perfis (a, b, c, d, e, f, g e h) baseados na suscetibilidade aos antimicrobianos. O perfil a (mais prevalente) apresentou, em 64,4% dos isolados, relação com o tipo A do REP-PCR e o grupo I do *Agr*. No entanto, também foram encontrados isolados com o perfil a relacionados a outros tipos determinados pelo REP-PCR e grupo *Agr*. Os demais perfis b, c, d, e, f, g e h foram menos prevalentes e corresponderam a 28,6% dos isolados. Desta forma, não foi possível para estes isolados uma avaliação da relação entre estes perfis de suscetibilidade com a tipagem pelo REP-PCR e o polimorfismo *agr*.

TABELA 13. Características dos *S.aureus* isolados de CVC e frangos e comparação entre os métodos de tipagem.

Isolados	Origem	Tipo REP-PCR	Polimorfismo <i>agr</i>	Perfil suscetibilidade
C27	CVC	A	I	A
F2-1	CF	A	I	A
F2-4	CF	A	I	A
F2-3	CF	A	I	A
F5-2	CF	A	I	A
F5-3	CF	A	I	A
F5-5	CF	A	I	A
F8-3	CF	A	I	A
F13-4	CF	A	I	A
F21-1	CF	A	I	A
F13-2	CF	A	I	A
F27-3	CF	A	I	A
C126	CVC	A	I	A
C164	CVC	A	I	A
C189	CVC	A	I	G
F29-3	CF	A	I	A
F5-4	CF	A	I	A
F26-2	CF	A	I	A
F26-1	CF	A	I	A
F21-2	CF	A	I	A
C33	CVC	A	I	A
C58	CVC	A	I	A
F2-2	CF	A	I	A
F3-3	CF	A	I	A
F4-2	CF	A	II	G
F21-3	CF	A	I	A
F21-7	CF	A	I	A
F21-8	CF	A	I	A
F26-3	CF	A	I	A
F26-4	CF	A	I	A
F5-1	CF	A	I	A
C118	CVC	B	II	E
C119	CVC	B	I	G
C120	CVC	B	I	A
C222	CVC	B	I	A
C247B	CVC	B	II	E
C63B	CVC	B	I	A
C64	CVC	B	I	A
C114	CVC	B	I	A
C244	CVC	C	I	A

Continuação da tabela 13

Isolados	Origem	Tipo REP-PCR	Polimorfismo <i>agr</i>	Perfil suscetibilidade
C192	CVC	C	I	A
C239	CVC	C	III	A
C87	CVC	C	III	A
C96	CVC	C	III	A
F1-1	CF	D	III	G
C202	CVC	D	I	A
C187	CVC	D	III	A
F2-5	CF	E	I	A
C176	CVC	F	II	H
C60	CVC	G	III	A
C212	CVC	H	II	D
C219A	CVC	I	II	A
C56B	CVC	J	II	D
C28	CVC	J	II	B
C53	CVC	J	II	C
C46	CVC	J	II	C
C49	CVC	J	II	A
F4-3	CF	J	II	G
F4-1	CF	J	II	G
C65	CVC	J	II	D
C86B	CVC	J	II	F
C209	CVC	J	II	B
C72	CVC	L	I	E

CF: carne de frango, CVC: cateter venoso central

## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 Detecção das enterotoxinas estafilocócicas

Genes codificadores das SEs foram encontrados em 47,06% dos isolados de CVC, com *sea* (44,11%), *sec* (8,82%) e *seb* (5,88%). A prevalência dos genes das SEs observada no presente estudo está um pouco abaixo do observado em estudos com isolados clínicos de *S.aureus*. Wattinger et al., (2012) e Park et al. (2012) encontraram os genes das enterotoxinas em 72% e 75%, respectivamente. No entanto, o percentual encontrado em nossos isolados de CVC foi de acordo com o descrito de 42% a 52%, em cepas colonizantes isoladas da nasofaringe em indivíduos assintomáticos (Wattinger et al., 2012; Monecke et al., 2009; Kuehnert et al., 2006).

Assim como neste estudo, Kamarehei et al. (2013) e Wattinger et al. (2012) também encontraram maior prevalência do gene *sea*. Já os genes *sed* e *see* não foram detectados.

A prevalência dos genes das SEs foi menor em relação a outros trabalhos em isolados de alimentos. Alta prevalência dos genes em *S. aureus* tem sido relatada com bastante frequência: 69%, 68.4%, 67% e 69% (Pereira et al., 2009; Rall et al., 2008; Morandi et al., 2007; Normanno et al., 2007). Nossos resultados foram semelhantes a estudos que encontraram: 34,8% em carne de porco crua e presunto cru (Atanassova et al., 2001) e 16% a partir de carne bovina e de porco (Pu et al., 2011).

A prevalência dos genes das SEs vem divergindo em isolados de alimentos. Em nosso estudo, em isolados de carne de frango, o gene *sea* foi o único gene das enterotoxinas encontrado em 31,03% (9/29). O gene *sea* vem sendo relatado entre vários trabalhos como o mais prevalente (Pereira et al., 2009; Rall et al., 2008; Morandi et al., 2007) e a mais comum toxina implicada nas intoxicações alimentares estafilocócicas. (Balaban & Rasooly, 2000; Holmberg & Blake, 1984). Já outros estudos relatam o gene *sed* como uma das predominantes enterotoxinas recuperadas em alimentos envolvidos em surtos (Pu et al., 2011; Normano et al., 2007).

Os genes das enterotoxinas *seb*, *sec*, *sed* e *see* não foram detectados nos isolados de carne de frango. Pu et al. (2011) não encontrou os genes *seb*, *sec*, ou *see* em isolados de carne. Assim como, Spanu et al. (2012) também não encontrou os genes *seb*, *sed* e *see* em isolados de queijos.

Pesquisas revelaram ocorrência de *S.aureus* enterotoxigênicos, variando de 21-54% (Loeto et al, 2007; Figueroa et al., 2002; Soares et al., 1997). Estes dados estão de acordo com e encontrado neste trabalho em isolados de carne de frango.

## **5.2 Suscetibilidade aos antimicrobianos**

A maior taxa de resistência encontrada foi para a penicilina, com 88,23% (30/34) e 86,20% (25/29), respectivamente, em isolados de CVC e carne de frango. Os dados encontrados foram de acordo com o panorama atual mundial de disseminação da resistência à penicilina em todos os ambientes. Tanto em isolados clínicos (91 a 98%) quanto alimentares (71 a 92%), as taxas



encontradas vêm sendo elevadas (Pu et al., 2011; Yucel et al., 2011; Pereira et al., 2009; Sader et al., 2004, 2001).

A resistência de 18% em isolados de CVC foi menor que as taxas encontradas referentes ao isolamento de MRSA em hospitais brasileiros (Sader et al., 2009; Lutz & Barth, 2006). Dados do SENTRY *Antimicrobial Surveillance Program*, no período de 2003 a 2008, referiram a detecção da resistência a oxacilina em aproximadamente 32% dos *S. aureus* (Gales et al., 2009). No entanto, como a contaminação de dispositivos médicos, como o CVC, pode ocorrer tanto por cepas originalmente colonizantes ou infectantes do ambiente hospitalar. No Brasil, estudos que verificaram a colonização por MRSA em pacientes no momento da admissão, encontraram baixas taxas de 0,7%, 13% e 6,1% de MRSA (Santos et al., 2010; Cavalcanti et al., 2006; Ribeiro et al., 2005).

Nenhum isolado de carne de frango foi resistente a oxacilina. A ocorrência de isolados MRSA em alimentos vem sendo relatada ao redor do mundo. No entanto, a prevalência ainda é baixa, variando de 0,2% a 3,8% (Yucel et al., 2011; Normanno et al., 2007; Van Loo et al., 2007; Kitai et al., 2005) No Brasil, Risek et al. (2011) reportou 9% de isolados resistentes a oxacilina em isolados de alimentos.

Os valores encontrados de resistência aos demais antimicrobianos em isolados de CVC foram, com exceção à penicilina, abaixo aos reportados em isolados nosocomiais no Brasil (Gales et al., 2009; Lutz & Barth, 2006; Sader et al., 2006; Sader et al., 2004). Os isolados que foram multirresistentes foram os mesmos, 17,7% (6/34), também resistentes a oxacilina.

De uma forma geral, tem se visto que isolados clínicos de *S.aureus* são menos suscetíveis aos antimicrobianos quando comparados a isolados de alimentos (Yucel et al., 2011). Neste estudo, com exceção à penicilina, não foi encontrado nenhum isolado de carne de frango resistente aos outros antimicrobianos testados. Estes resultados concordam com prévios trabalhos em que a incidência de resistência antimicrobiana entre cepas de *S.aureus* isoladas de alimentos é baixa (Hanning et al., 2012; Yucel et al., 2011).

Considerando a manipulação humana na indústria de alimentos como uma das principais fontes de contaminação aos alimentos. Estudos que avaliaram o perfil de suscetibilidade de isolados de manipuladores de alimentos também encontraram perfil semelhante, com altas taxas de resistência a penicilina e elevada sensibilidade a outros antimicrobianos testados (Jordá et al., 2012; Grandó et al., 2008).

### **5.3 Determinação da produção de biofilme**

No grupo dos isolados de CVC, apenas 5,88% (2/34) formaram biofilme. A não detecção da formação de biofilme *in vitro* em isolados de CVC pode ser devida a perda da interação, que ocorre *in vivo*, no momento da adesão com os componentes da matriz do hospedeiro para aderência das bactérias. A formação do biofilme *in vivo* em dispositivos médicos sabidamente envolve componentes do hospedeiro (Gotz et al., 2002).

Tal como acontece com muitas outras espécies bacterianas, o método mais amplamente utilizado para avaliar a formação de biofilme *in vitro*, em *Staphylococcus* sp., é o teste em placas de microtitulação. No entanto, no caso de isolados clínicos de *S. aureus*, tem se verificado a necessidade de

empregar modificações específicas no ensaio, incluindo o pré-revestimento das cavidades da placa de microtitulação com moléculas da matriz humana ou adição de soro humano e suplementação do meio com sal e glicose, para maior aproximação com a situação *in vivo* durante a infecção (Otto, 2013; Cassat et al., 2007).

Além disso, a capacidade de formação do biofilme parece ser transitória durante o processo de infecção. Uma vez que, para a invasão de células endoteliais e epiteliais, sepse e espalhamento, é vantajoso para células bacterianas se desprenderem do biofilme e se tornarem células planctônicas. Da mesma forma, estas células planctônicas podem recuperar um fenótipo de biofilme positivo e aderir novamente em dispositivos médicos (Gotz, 2002). Estes isolados de CVC, portanto, podem estar numa fase em que a formação de biofilme não se mostrou vantajosa para a bactéria.

Além disso, na maioria dos ambientes naturais, os biofilmes consistem de comunidades microbianas multiespécies (Zhang et al., 2014). Nas infecções associadas ao uso de biomateriais, cerca de 80% das células envolvidas são *S. epidermidis* (Vadyvaloo & Otto 2005; Vuong et al., 2003; Von Eiff et al., 1999). Diversos trabalhos demonstram a maior capacidade de formação de biofilme desta espécie, que é o principal colonizante da pele humana (Mertens et al., 2013; Rohde et al., 2007). Os isolados de *S.aureus* de dispositivos médicos podem estar presentes na estrutura dos biofilmes polimicrobianos formados pela espécie *S.epidermidis*, numa forma de consórcio microbiano.

A detecção da formação de biofilme em isolados clínicos de *S.aureus* tem variado entre 29,7% a 100% em diversos materiais (Cakir et al., 2013; Jo et al., 2013; Reiter et al., 2011; Rohde et al., 2007; Knobloch et al., 2002). Em dispositivos médicos, Rohde et al. (2007) encontrou que todos isolados foram formadores de biofilme.

Nos isolados de carne de frango, 93,10% (27/29) formaram biofilme, com oito moderados e 19 fortes formadores. Alguns trabalhos demonstraram a capacidade dos micro-organismos aderirem e se fixarem em fibras de origem animal (Campbell et al, 1987; Notermans & Kampelcher, 1984). Esta aderência resulta na ineficiência dos procedimentos de lavagem e remoção das células aderidas às carcaças (Giaouris et al., 2013; Zottola & Sasahara, 1994). Marino et al. (2010), encontrou em isolados de alimentos e em mãos de manipuladores a capacidade de formar biofilme em 92% dos isolados.

Rodrigues et al. (2010) avaliou a formação de biofilme em *S.aureus* isolados de um abatedouro de aves no sul do Brasil e encontrou que todos os isolados foram capazes de produzir biofilme. Este trabalho foi em concordância com o alto percentual de formadores de biofilmes encontrados em nosso estudo de *S.aureus* isolados de carne de frango.

#### **5.4 Polimorfismo do *locus agr***

O polimorfismo I foi o mais prevalente (63,49%), seguido do polimorfismo II (25,39%) entre os isolados de CVC e carne de frango. Os polimorfismos I e II do operon *agr* vêm sendo os mais encontrados em isolados clínicos de *S.aureus* (Chen et al., 2012; Almeida et al., 2013; Montanaro et al., 2010; Traber et al., 2008; Gilot et al., 2004; Goerke et al., 2003). Estudos

demonstram que o polimorfismo I predomina em isolados colonizantes de indivíduos saudáveis e em infecções que se originam na comunidade (Chen et al., 2012; Cafiso et al., 2007; Goerke et al., 2003; Jarraud et al., 2002; Leeuwen et al., 2000).

Nossos resultados, quanto ao polimorfismo do grupo de CVC, foram comparáveis com de Traber et al., (2008), que encontraram maior predomínio de isolados portando o polimorfismo tipo I (50%), seguido do II (33,3%), III (13,7%) e IV (0,9%) em diversos materiais clínicos, com exceção do grupo IV, que não foi detectado em nosso estudo. Cafiso et al. (2007) em isolados de infecções envolvendo CVC verificou maior prevalência do polimorfismo I com 41,4%, seguido de 34,5% polimorfismo II, 13,8% para o IV e 10,3% para o III.

O polimorfismo II foi o segundo mais prevalente em nosso estudo. Estudos mostram que o predomínio do polimorfismo I ou II em isolados clínicos está relacionado com a origem da infecção. O polimorfismo I vinculado a infecções desenvolvidas na comunidade, e o polimorfismo II a infecções hospitalares adquiridas através de cepas presentes no ambiente hospitalar (Goerke et al., 2003; Peacock et al., 2002; Leeuwen et al., 2000). Em nosso estudo, houve maior predomínio do polimorfismo II no grupo de isolados de CVC comparado ao grupo de isolados de carne de frango ( $p < 0,05$ ). O maior predomínio no grupo dos isolados de CVC do grupo agr II em relação aos isolados de carne de frango é condizente, uma vez que, se espera o envolvimento de cepas hospitalares neste tipo de infecção.

O polimorfismo I tem sido o predominante entre isolados de *S.aureus* colonizantes (Thomsen et al., 2011; Goerke et al., 2003). No nosso

estudo, o polimorfismo I foi encontrado em 86% dos isolados de carne de frango. Sabendo-se que uma possível fonte de contaminação dos alimentos é a transmissão das bactérias colonizantes presentes nos manipuladores aos alimentos. A distribuição encontrada nos isolados de carne de frango foi concordante com Goerke et al. (2003) que encontrou em isolados de indivíduos saudáveis, a distribuição do *locus agr* com 41% para polimorfismo I, 28% II, 23% III e 8% IV.

Os seis isolados MRSA apresentaram o perfil II do polimorfismo *agr*. Os demais isolados *Staphylococcus aureus* sensível à meticilina (MSSA) foram distribuídos nos polimorfismos I, II e III. Embora o polimorfismo I seja o dominante em isolados nosocomiais, tem se visto um predomínio do grupo II entre isolados MRSA (Hu et al., 2013; Chong et al., 2012; Ikonomidis et al., 2009; Sakoulas et al., 2003).

O polimorfismo IV não foi presente nos isolados de CVC e carne de frango. Isolados portando o polimorfismo IV são considerados raros, com exceção das doenças mediadas pelas toxinas esfoliativas (Jarraud et al., 2002). A taxa encontrada em diversos trabalhos para o polimorfismo IV está entre 0,9 a 13% (Chong et al., 2012; Montanaro et al., 2010; Ikonomidis et al., 2009; Traber et al., 2008; Cafiso et al., 2007; Gilot et al., 2004; Goerke et al., 2003). Além disso, diversos trabalhos podem estar detectando erroneamente o polimorfismo IV, quando a metodologia escolhida para detecção envolve a técnica de RFLP (Ikonomidis et al., 2009; Cafiso et al., 2007; Goerke et al., 2005).

Primeiramente neste estudo, cerca de oito isolados haviam sido determinados pela metodologia do RFLP pertencentes ao polimorfismo IV, porém com o sequenciamento, os isolados na verdade pertenciam aos grupos I e III e haviam sofrido mutações nas regiões de reconhecimento da enzima de restrição e, portanto, seus DNAs não foram clivados pela mesma.

### **5.5 Expressão da $\delta$ -hemolisina**

A detecção da produção da  $\delta$ -hemolisina vem sendo utilizada como um marcador da função do sistema Agr. Em isolados de CVC, apenas em quatro (11,77%) isolados não houve detecção da produção da  $\delta$ -hemolisina. Embora os trabalhos relatem que a maioria dos isolados clínicos de *S. aureus* expressem o sistema Agr (Gagnaire et al., 2012; Vuong et al., 2000; Traber et al., 2008). Existem vários relatos de mutantes *agr* defeituosos isolados de pacientes infectados. Estima-se que 15 a 60% das infecções associadas a *S.aureus* apresentam isolados com Agr afuncional (Chong et al., 2012; Traber et al., 2008; Fowler et al., 2004; Sakoulas et al., 2002; Goerke et al., 2000).

A função comprometida do sistema Agr pode ser devida a mutações de ponto, perda da função de outros genes requeridos para a função do Agr, supressão do *agr* por mutações nos genes reguladores, ou a interrupção da secreção de  $\delta$ -hemolisina secundária a anomalias na parede das células destes isolados (Adhikari et al., 2007).

Em infecções agudas, a expressão de toxinas que atacam os tecidos do hospedeiro, presente em cepas *agr* positivas, parece ser importante para a virulência bacteriana, enquanto que, nas infecções crônicas, um fenótipo *agr* negativo contribui para o aumento da persistência e capacidade de aderência a

polímeros. Um fenótipo Agr negativo é considerado uma vantagem em infecções associadas ao uso de cateter (Gagnaire et al., 2012; Water & Bassler, 2005; Vuong et al., 2000). Cafiso et al. (2008) em 69% dos isolados de infecções relacionadas a CVC encontrou o sistema Agr afuncional.

Embora observações sugiram que a perda da função Agr pode conferir de forma independente uma vantagem para estes isolados em persistir em dispositivos biomédicos através da formação de biofilme (Yarwood et al., 2007; Vuong et al., 2000), um baixo percentual de isolados Agr negativos (11,77%) foram encontrados em isolados de CVC. O baixo percentual encontrado para disfunção Agr em isolados de CVC é condizente com dados encontrados em isolados colonizantes. Shopsis et al. (2008) encontrou que 9% de isolados colonizantes apresentavam Agr afuncional. O isolamento de *S.aureus* expressando o sistema Agr em dispositivos médicos indica que estes isolados podem estar presentes, não envolvidos na forma crônica da infecção local, e sim, de forma ativa podendo causar potenciais infecções invasivas através da expressão do sistema Agr e de fatores de virulência.

Em isolados de carne de frango, apenas 3,44% produziram  $\delta$ -hemolisina, enquanto 96,56% foram negativos e não expressavam o sistema Agr. Em alimentos, poucos estudos avaliaram a expressão do sistema Agr. Pereira et al. (2009) analisaram a capacidade de produção da  $\delta$ -hemolisina e encontrou a não produção em 89% dos isolados de alimentos.

Em alimentos, a carga microbiana muitas vezes não se encontra elevada, e as condições para o crescimento bacteriano não ideais. Sabe-se que em populações pequenas, *S.aureus* mantém seu sistema Agr inativo,



induzindo a produção de proteínas de superfície que facilitam a aderência da bactéria a superfícies e a colonização. À medida que a população cresce, em decorrência a condições que favoreçam a multiplicação bacteriana, uma ativação para a expressão do sistema Agr ocorre, e assim, a produção de fatores de virulência. (Jabbari et al., 2012; Water & Bassler, 2005).

A expressão do sistema Agr apresenta para bactéria um alto custo adaptativo. Embora, a origem da contaminação dos alimentos com *S.aureus*, possa ser bactérias originadas da microbiota de manipuladores de alimentos e tenha se relatado que isolados colonizantes apresentam um sistema Agr ativo. (Shopsin et al., 2008). No entanto, fora do hospedeiro, em isolados de alimentos, no nosso estudo, o sistema Agr mostrou-se estar inativo, indicando uma reduzida virulência destes isolados. Deste modo, com o sistema Agr atenuado, se sobressaem nestes isolados a expressão de fatores envolvendo a aderência bacteriana (Novick et al., 2003).

### **5.6 Relação entre produção de biofilme e genótipo agr**

A análise do polimorfismo *agr* e da formação de biofilme mostrou não haver correlação, visto que o fator definitivo para determinação da capacidade de formação do biofilme foi a origem do isolado neste estudo ( $P < 0,01$ ). A avaliação desta relação pode ter ficado comprometida devido à baixa capacidade de formação de biofilme apresentada pelo grupo dos isolados de CVC.

Cafiso et al., (2007) em um estudo que avaliou a correlação entre formação de biofilme e o polimorfismo *agr* em isolados de infecções de CVC e um grupo controle encontrou que fortes formadores de biofilme apresentavam o

perfil II do polimorfismo, moderados formadores apresentaram perfil III, e isolados com perfil I e IV foram fracos ou não formadores de biofilme. Kawamura et al. (2011) também encontrou que cepas agr II formaram biofilmes significativamente maiores que cepas agr I e III. No nosso estudo, apenas 12% (1/15) dos isolados com polimorfismo II formaram biofilme. O polimorfismo I com 65% (26/40) apresentou o maior percentual, seguido do polimorfismo III com 29% (1/7).

### **5.7 Prevalência dos genes envolvidos com a formação de biofilme entre os isolados de frangos e CVC de *S.aureus***

Em nosso estudo, 100% dos isolados de CVC para ambos os genes, e 93% e 100% dos isolados de carne de frango apresentaram o gene *icaA* e *sasG*, respectivamente. A presença do gene *icaA* ou do operon *icaADBC* em todos isolados clínicos já havia sido encontrado em outros trabalhos (Reiter et al., 2012; Knobloch et al., 2002; Rohde et al., 2001; Cramton et al., 1999). Em alimentos, Vazquez-Sanchez et al. (2013) e Gutierrez et al. (2012) também detectaram o gene *icaA* em todos os isolados. Estes dados colaboram com o achado de que operon *icaADBC* está presente virtualmente em todas as cepas de *S.aureus*.

Sung et al. (2008) relatou que a maioria dos isolados clínicos de *S. aureus* foram *sasG* positivo, já a maioria dos isolados de espécies animais foram *sasG* negativos. À adesina SasG, que medeia a adesão e colonização em humanos, vem sendo atribuído papel como determinante de especificidade com o hospedeiro humano. A ampla presença do gene *sasG* em isolados de

carne de frango são condizentes com a provável origem da contaminação destes isolados sendo manipuladores de alimentos.

Os genes *icaA* e *sasG* estiveram presentes em praticamente todos os isolados de carne de frango e CVC. O gene *icaA* tem sido amplamente relacionado como um determinante importante para o fenótipo de biofilme em *S. aureus* (Reiter et al., 2012; Knobloch et al., 2002; Cramton et al., 1999). O papel do gene *sasG* na formação de biofilme é ainda menos estudado. SasG é uma adesina mediando a ligação a superfície das células epiteliais nasais (Roche et al., 2003). Mas passou a ser considerada uma importante proteína de biofilme, facilitando a adesão aos tecidos do hospedeiro em infecções por *S. aureus* (Geoghegan et al., 2010; Kuroda et al., 2008).

Embora, genes importantes para formação de biofilme, como *icaA* e *sasG*, estiveram presentes em ambos os grupos. A capacidade de formação de biofilme entre os isolados dos grupos CVC e carne de frango diferiu significativamente. Mesmo que genes importantes para o desenvolvimento de biofilmes estejam presentes nos isolados, a formação de biofilme envolve muitos mecanismos regulatórios. Para o operon *ica*, tem sido verificado que embora a maioria das cepas de *S. aureus* apresente o operon, somente poucas expressam e produzem biofilmes em ensaios em microplacas (Knobloch et al., 2002; Rohde et al., 2001)

Houve diferença embora não estatisticamente significativa ( $P > 0,05$ ) entre os grupos de isolados, quanto a prevalência do gene *atlA*. Em isolados de CVC, o gene não esteve presente em apenas um (2,9%) isolado, enquanto que em isolados de carne de frango, 14 (46,7%) não apresentaram o gene.

Reiter et al., (2012) encontraram os genes *icaA* e *atlA* em todos isolados, enquanto que o gene *sasG* foi presente em 73% (11/15) dos isolados, sendo detectado em todos isolados fortes formadores de biofilme. No nosso estudo, o gene *atlA* esteve presente em 97,05% os isolados de CVC, já em isolados de carne de frango foi encontrado em 52%. O gene *sasG* esteve presente em todos os isolados de CVC e de carne de frangos, diferentemente do estudo anterior, não foi verificada relação com a presença do gene e a capacidade de formação de biofilme. Recentemente, Reiter et al. (2012) descreveram pela primeira vez a presença de *sasG* em isolados clínicos de *S. aureus* na América do Sul. Neste trabalho, portanto, fazemos o primeiro relato descrevendo a presença do gene *sasG* em isolados de alimentos.

#### **5.8 Relação entre formação de biofilme e expressão do quorum sensing Agr através da produção da $\delta$ -hemolisina.**

A relação inversa entre ativação do sistema Agr e desenvolvimento de biofilme vem sendo relatada (Boles & Horswill, 2008; Yarwood et al., 2007; Vuong et al., 2000). Cafiso et al. (2007), em um estudo que avaliou a correlação entre formação de biofilme e o sistema Agr em isolados de infecções de CVC e um grupo controle encontrou que fortes formadores de biofilme não apresentavam um sistema Agr funcional. Já, isolados moderados e fracos formadores apresentaram funcionalidade do sistema Agr.

Quando avaliada a capacidade de formação de biofilme entre isolados produtores da  $\delta$ -hemolisina, foi visto que apenas 3% formaram biofilme. Já a formação de biofilme em isolados que não produziram a  $\delta$ -hemolisina foi fortemente pronunciada, presente em 88% destes isolados.

Estatisticamente houve uma correlação entre a expressão da  $\delta$ -hemolisina, ou seja, a expressão do *quorum sensing* Agr e a formação de biofilme ( $P < 0,01$ ).

Essencialmente, os resultados obtidos a partir da maioria dos isolados indicam que Agr não expresso poderia promover a formação de biofilme, em condições estáticas. Apenas um isolado formou biofilme e produziu a  $\delta$ -hemolisina e em quatro isolados que não formaram biofilme, também não produziram a  $\delta$ -hemolisina. Resultados divergentes também foram descritos anteriormente. Coelho et al. (2008) relataram que em 25% o Agr não expresso não afetou a formação de biofilme. Yarwood et al. (2004) mostraram que, sob algumas condições a perda da expressão do Agr poderia não ter influência detectável em biofilmes de *S. aureus*, enquanto que em outros poderia inibir ou aumentar a formação de biofilme. O'Neill et al. (2007) descobriu que mutações no Agr causaram o aumento significativo do biofilme em 23% dos isolados clínicos, mas não teve impacto significativo sobre a formação de biofilme nos restantes.

Nas infecções crônicas, um fenótipo Agr negativo contribui para o aumento da persistência e capacidade de aderência a polímeros (Vuong et al., 2000). O alto percentual em isolados de CVC da produção da  $\delta$ -hemolisina surpreende de certa forma, uma vez que um fenótipo Agr negativo é considerado uma vantagem em infecções associadas ao uso de cateter.

No entanto, um estudo que avaliou a expressão da  $\delta$ -hemolisina em um experimento de biofilme verificou que não houve a perda total de cepas  $\delta$ -hemolisina positivas no decorrer do desenvolvimento do biofilme, e sim, a ocorrência concomitante de uma população mista entre cepas produtoras e não

produtoras da  $\delta$ -hemolisina. A manutenção de uma população Agr positiva dentro do biofilme possibilitaria em determinado momento o desenvolvimento e expressão de um fenótipo invasivo numa fase adequada da infecção (Yarwood et al., 2007).

O baixo e alto percentual, encontrado nos isolados de carne de frango para, produção da  $\delta$ -hemolisina e formação de biofilme, respectivamente, indica que no nicho ecológico em que estas bactérias foram isoladas, as propriedades adesivas e o fenótipo de formação de biofilme são importantes para a adaptação, em detrimento da capacidade de virulência reduzida.

### **5.9 Diversidade genética dos isolados**

Análise molecular dos isolados através do REP-PCR não permitiu diferenciar os grupos correspondentes de isolados de CVC e carne de frango. Isolados de carne de frango apresentaram menor diversidade genética, correspondendo a apenas quatro clones, enquanto que isolados de CVC, tiveram onze clones identificados.

Um interessante achado deste trabalho foi em relação à similaridade encontrada entre isolados de CVC e frangos, podendo indicar uma mesma origem dos isolados, uma vez que ambos podem ter sido originados de cepas da microbiota humana. Os isolados de CVC e frangos apresentaram, em grande parte, o agrupamento em mesmos tipos. Para 92% (58/63) dos isolados, o nível de similaridade foi acima de 72%.

Um estudo que isolou e caracterizou *S.aureus* de carcaças de frango e comparou com isolados de *S. aureus* de humanos por MLST indicou

similaridade na sequência entre alguns isolados humanos e de carcaças de frangos (Hanning et al., 2012).

Sadoyama et al. (2008) encontraram que a maioria das cepas de *S.aureus* isoladas de cateter tiveram o mesmo genótipo de isolados obtidos da pele de pacientes. Além disso, foi verificado que todos pacientes portaram os isolados na pele antes da infecção. A contaminação destes dispositivos pode ocorrer, ou com isolados do próprio paciente ou com isolados presentes no ambiente hospitalar, originados de outros pacientes ou não, através das mãos de profissionais da saúde durante a manipulação do cateter (Sadoyama et al., 2008).

Os clones B, C, F, G, H, I e L foram encontrados apenas em isolados de CVC e representaram 52,94% (18/34) do total de isolados deste grupo. Estes isolados podem ser representativos de clones hospitalares. Já os clones A, D e J, que representaram 47,05% (16/34) e foram encontrados tanto em isolados de CVC quanto de carne de frango, podem se tratar de isolados colonizantes.

Embora, se conheça a limitação do REP-PCR frente a outras técnicas como PFGE e MLST, que permitem diferenciar cepas com idêntico perfil de bandas pelo REP-PCR (Church et al., 2011; Goerke et al., 2005; Santos et al., 2001; Deplano et al., 2000). A comparação dos isolados de *S.aureus* de carne de frango e CVC através da tipagem pelo método de REP-PCR se mostrou um método útil, simples e barato para uma avaliação inicial de isolados relacionados geneticamente.

### **5.10 Relação entre a diversidade genética, polimorfismo *agr* e perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos**

A análise da diversidade genética através da técnica do REP-PCR mostrou que isolados na sua maioria foram divididos de acordo com os quatro grupos Agr. Tem sido constatado que a distribuição dos grupos Agr apresenta forte relação com características genéticas das cepas, e que poderia representar a primeira subdivisão da espécie *S. aureus* (Goerke et al., 2005; Novick, 2003; Jarraud et al., 2002).

Assim como neste trabalho, Jarraud et al. (2002) também verificou quando analisou o locus *agr* e análise genética por AFLP, que isolados dos grupos III e IV foram mais individualizados, enquanto dos grupos I e II foram parcialmente sobrepostos.

Isolados com polimorfismo I foram presentes nos tipos A, B, C, D, E e L. O polimorfismo II foi encontrado nos tipos B, F, H, I e J, e o polimorfismo III, nos tipos C, D e G. Pode-se verificar que os polimorfismos I e II tiveram maior disseminação, sendo encontrados em maior número de clones.

Para os dois tipos mais prevalentes A e J, foi possível verificar que no tipo A, 96,77% (30/31) dos isolados apresentaram o polimorfismo I e no tipo J, todos os isolados pertenceram ao grupo II do polimorfismo.

Houve discordância para apenas cinco isolados quanto ao perfil Agr e o agrupamento pelo REP-PCR. Estes isolados foram agrupados em determinados tipos com isolados que portavam diferentes grupos Agr.

O teste de suscetibilidade antimicrobiana tem sido utilizado para sugerir a relação de vários isolados recuperados, ou de um mesmo paciente,



ou de isolados coletados ao longo de um mesmo período. A importância que o perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos, apresenta está em sua capacidade para rapidamente mostrar a discriminação entre vários isolados, que poderiam parecer fenotipicamente semelhantes.

Como neste estudo, buscou-se caracterizar isolados de *S.aureus* isolados de CVC e carne de frango e avaliar uma possível relação genética entre estes diferentes grupos. Embora, através do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos tenham sido encontrados oito perfis distintos. Não houve concordância frente aos resultados referentes ao REP-PCR e ao polimorfismo *agr*. Além do que, em isolados de alimentos, que apresentaram um amplo perfil de sensibilidade aos antimicrobianos, o método de avaliação torna-se impróprio para diferenciação de clones.

O perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos, em geral, não é considerado um método acurado para cepas não relacionadas (Clarridge et al., 2013). Nós verificamos neste estudo, que isolados com o mesmo tipo no REP-PCR exibiram diferentes perfis de suscetibilidade aos antimicrobianos, enquanto cepas com diferentes tipos do REP-PCR tiveram o mesmo perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos. Portanto, a relação entre perfil de suscetibilidade e tipos do REP-PCR foi imprecisa. Testes de suscetibilidade aos antimicrobianos tem, relativamente, um limitado uso em estudos epidemiológicos devido à variação fenotípica dos isolados (Clarridge et al., 2013; Santos et al., 2001). Peacock et al. (2002) mostrou por MLST que cepas de *S. aureus* com um núcleo genômico central idêntico poderia variar em seu conteúdo de genes de virulência. Genes de resistência, assim como, genes de

virulência fazem parte também da porção variável do núcleo genômico da bactéria, podendo ser transmitidos horizontalmente e verticalmente entre células bacterianas. Estes genes, muitas vezes, são codificados por elementos genéticos móveis. Desta forma, cepas com mesmo núcleo genômico podem diferir no perfil de suscetibilidade.

## 6 CONCLUSÕES

A técnica do RFLP se mostrou adequada para a tipagem dos isolados dentro dos grupos polimórficos do sistema Agr. Foi possível verificar diferenças entre os isolados de CVC e de carne de frango, quanto ao predomínio de determinados polimorfismos e a sua distribuição nos grupos. O polimorfismo I esteve mais relacionado a isolados de frangos e o polimorfismo II com isolados de CVC.

A produção da  $\delta$ -hemolisina diferiu entre os grupos analisados, presente, em sua maioria, em isolados de CVC. Já, em isolados de carne de frango, em geral, a mesma não foi produzida. A detecção da  $\delta$ -hemolisina em isolados de CVC indica um sistema Agr ativo para estes isolados. Já, em isolados de carne de frango, o mesmo não ocorreu, sugerindo um sistema Agr não funcional. A relação entre a produção da  $\delta$ -hemolisina e a formação de biofilme foi constatada neste estudo. Em geral, os isolados que não produziram  $\delta$ -hemolisina foram capazes de formar biofilme, e isolados que produziram  $\delta$ -hemolisina não foram capazes de formar.

Em relação à capacidade de formação de biofilme, isolados de carne de frango foram capazes de formar biofilme, enquanto isolados de CVC, não apresentaram esta capacidade no ensaio fenotípico em microplaca.

Foi possível verificar que tanto isolados de CVC quanto de frango portaram os genes avaliados neste estudo envolvidos com a formação de biofilme.

Não houve diferença quanto a detecção dos genes das enterotoxinas clássicas em isolados de CVC e carne de frango.

Em geral, entre os grupos, predominaram isolados com perfil de sensibilidade aos antimicrobianos. No entanto, isolados de carne de frango se mostraram mais sensíveis aos antimicrobianos testados. Em isolados de CVC, poucos isolados foram resistentes, e os que foram se mostraram multirresistentes.

Não foi possível determinar neste estudo uma relação entre o polimorfismo *agr* e a capacidade de formação de biofilme.

Através da análise da diversidade genética pela técnica do REP-PCR, foi encontrado haver maior diversidade clonal entre isolados de CVC comparado aos isolados de carne de frango.

Não foi possível diferir os grupos de CVC e frangos através da análise molecular. Houve, em geral, para a maioria dos isolados, uma grande similaridade entre isolados dos grupos de CVC e carne de frango.

Quando avaliado a distribuição dos grupos *Agr* em relação aos agrupamentos determinados pelo REP-PCR, pode-se verificar que para grande parte dos isolados, a distribuição ocorreu de acordo.

## 7 PERSPECTIVAS

Aumentar a amostragem dos isolados de alimentos e clínicos, de maneira a obter resultados mais representativos.

Avaliar a capacidade de formação de biofilme dos isolados de CVC em protocolo utilizando o pré-revestimento das cavidades da placa de microtitulação com moléculas da matriz humana ou adição de soro humano.

Avaliar outros genes determinantes de virulência para os isolados de CVC e frangos.

Avaliar a expressão da  $\delta$ -hemolisina em diferentes meios de crescimento no ensaio de formação de biofilme.

Confirmar os resultados da expressão da  $\delta$ -hemolisina através da avaliação da expressão do sistema Agr por RT-PCR.

## 8. REFERÊNCIAS

- ABDELNOUR, A.; ARVIDSON, S.; BREMELL, T.; RYDÉN, C.; TARKOWSKI, A. The accessory gene regulator (*agr*) controls *Staphylococcus aureus* virulence in a murine arthritis model. **Infect Immun.** v.61, n.9, p.3879-85, 1993.
- ADHIKARI, R.P.; ARVIDSON, S.; NOVICK, R.P. A nonsense mutation in *agrA* accounts for the defect in *agr* expression and the avirulence of *Staphylococcus aureus*. **Infect Immun.** v.75, n.9, p.4534-40, 2007.
- ALMEIDA, L.M.; ZILTA, M.; DE ALMEIDA, P.R.B.; MENDONÇA, C.L.; MAMIZUKA, L.M. Comparative analysis of *agr* groups and virulence genes among subclinical and clinical mastitis *Staphylococcus aureus* isolates from sheep flocks of the Northeast of Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology.** V.44, n.2, p.493-498, 2013.
- ANDERL, J. N.; ZÄHLLER, J.; ROE, F.; STEWART, P. S. Role of nutrient limitation and stationary-phase existence in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin. **Antimicrob. Agents Chemother.** V.47, p.1251–1256, 2003.
- ANTUNES, A.L.; BONFANTI, J.W.; PEREZ, L.R.; PINTO, C.C.; FREITAS, A.L.; MACEDO, A.J.; BARTH, A.L. High vancomycin resistance among biofilms produced by *Staphylococcus* species isolated from central venous catheters. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** V.106, n.1, p.51-5, 2011.
- ARBUTHNOTT, J. P.; COLEMAN, D. C.; DE AZAVEDO, J. S.. *Staphylococcal* toxins in human disease. **Soc. Appl. Bacteriol. Symp.** V.19, p.101S–107S, 1990.
- ATANASSOVA, V.; MEINDL, A.; RING C. Prevalence of *Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxins in raw pork and uncooked smoked ham--a comparison of classical culturing detection and RFLP-PCR. **Int J Food Microbiol.** V.68, n.1-2, p.105-13, 2001.
- BARBER, M. & ROZWADOWSKA-DOWZENKO, M. Infection by penicillin-resistant *staphylococci*. **Lancet.** V.2, n.6530, p.641-4, 1948.
- BAE, Y.M.; BAEK, S.Y.; LEE, S.Y. Resistance of pathogenic bacteria on the surface of stainless steel depending on attachment form and efficacy of chemical sanitizers. **Int J Food Microbiol.** V.153, n.3, p.465-73, 2012.

Balaban, N. & Rasooly, A. *Staphylococcal* enterotoxins. **Int J Food Microbiol.** V.61, p.1–10, 2000.

BISWAS, R.; VOGGU, L.; SIMON, U.K.; HENTSCHEL, P.; THUMM, G.; GÖTZ, F. Activity of the major *staphylococcal* autolysin Atl. **FEMS Microbiol Lett.** V.259, n.2, p.260-8, 2006.

BALABAN, N. & NOVICK, R.P. Autocrine regulation of toxin synthesis by *Staphylococcus aureus*. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v.92, n.5, p.1619-23, 1995.

BALABAN, N. & RASOOLY, A. *Staphylococcal* enterotoxins. **Int J Food Microbiol.** V.61, n.1, p.1-10, 2000.

BANNERMAN, T.L. *Staphylococcus*, *Micrococcus*, and other catalase-positive cocci that grow aerobically. In PR Murray, E.J., Jorgensen, M.A., Jolken (eds). **Manual of Clinical Microbiology**, ASM, Washington, p. 384-404, 2003.

BARTON, M.D. Antibiotic use in animal feed and its impact on human health. **Nutr Res Rev.** v.13, n.2, p.279-99, 2000.

BAUER, A.W.; KIRBY, W.M.M.; SHERRIS, J.C. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **Am J Clin Pathol**, United States, v.45, p.493-496, 1966.

BAYLES, K.W. & IANDOLO, J.J. *J Bacteriol.* Genetic and molecular analyses of the gene encoding staphylococcal enterotoxin D. v.171, n.9, p.4799-806, 1989.

BENITO, Y.; KOLB, F.A.; ROMBY, P.; LINA, G.; ETIENNE, J.; VANDENESCH, F. Probing the structure of RNAIII, the *Staphylococcus aureus* agr regulatory RNA, and identification of the RNA domain involved in repression of protein A expression. **RNA.** V.6, p.668–79, 2000.

BOLES, B.R. & HORSWILL, A.R. Agr-mediated dispersal of *Staphylococcus aureus* biofilms. **PLoS Pathog.** V.4, n.4, p.e1000052, 2008.

BRASIL. **Ministério da Saúde** (2009). Disponível on-line em [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/analise\\_ep\\_surtos\\_dta\\_brasil\\_2009.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/analise_ep_surtos_dta_brasil_2009.pdf) acesso em 08 de Novembro de 2010.

BOHACH, G.A. & SCHLIEVERT, P.M. Nucleotide sequence of the staphylococcal enterotoxin C1 gene and relatedness to other pyrogenic toxins. **Mol Gen Genet.** V.209, v.15–20, 1987.

CAFISO V<sup>1</sup>, BERTUCCIO T, SANTAGATI M, DEMELIO V, SPINA D, CAVALCANTI, S.M.M.; FRANÇA, E.R.; VILELA, M.A.; MONTENEGRO, F.; CABRAL, C.; MEDEIROS, A.C.R. Comparative study on the prevalence of *Staphylococcus aureus* imported to intensive care units of a university hospital, Pernambuco, **Brazil. Rev Bras de Epidemiol.** V.9, p.436-46, 2006.

- CAKIR AKTAS, N.; ERTURAN, Z.; KARATUNA, O.; KARAHASAN YAGCI, A.; Panton-Valentine leukocidin and biofilm production of *Staphylococcus aureus* isolated from respiratory tract. 2013. **J Infect Dev Ctries.** V7, n. 11, p.888-91, 2013.
- CASSAT, J.E.; LEE, C.Y.; SMELTZER, M.S. Investigation of biofilm formation in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. **Methods Mol Biol.** V.391, p.127-44, 2007.
- CAMPBELL, S., DUCKWORTH, S., THOMAS, C.J. AND MCMEEKIN, T.A. A note on adhesion of bacteria to chicken muscle connective tissue. **J. Appl. Bacteriol.** V.63, p.67-71, 1987.
- CDC. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. v.51, n.26, p.565–567, 2002.
- CHAMBERS, H.F. Methicillin-resistant *staphylococci*. **Clin Microbiol Rev.** v.1, p.173–86, 1988.
- CHEN, K.Y.; CHANG, H.J.; HSU, P.C.; YANG, C.C.; CHIA, J.H.; WU, T.L.; HUANG, C.T.; LEE, M.H. Relationship of teicoplanin MICs to treatment failure in teicoplanin-treated patients with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* pneumonia. **J Microbiol Immunol Infect.** V.46, n.3, p.210-6, 2013.
- CHEUNG, A.L.; EBERHARDT, K.J.; CHUNG, E.; YEAMAN, M.R.; SULLAM, P.M. Diminished virulence of a *sar*-/*agr*- mutant of *Staphylococcus aureus* in the rabbit model of endocarditis. **J. Clin. Invest.** V.94, p.1815–22, 1994.
- CHIOU, C.S.; WEI, H.L.; YANG, L.C. Comparison of pulsedfield gel electrophoresis and coagulase gene restriction profile analysis techniques in the molecular typing of *Staphylococcus aureus*. **J Clin Microbiol.** v.38, p.2186–2190, 2000.
- CHONG, Y.P.; KIMA, E.S.; PARKA, S.J.; PARKA, K.H.; KIMA, T.; KIMB, M.; KIMA, S.H.; LEEA, S.O.; CHOIA, S.H.; WOOA, J.H.; JEONGC, J.Y.; KIMA, Y.S. Accessory Gene Regulator (*agr*) Dys 1 function in *Staphylococcus aureus* Bloodstream Isolates from Korean Patients **Agents Chemother.** , 2012.
- CHURCH, D.L.; CHOW, B.L.; LLOYD, T.; GREGSON, D.B. Comparison of automated repetitive-sequence based polymerase chain reaction and *spa* typing versus pulsed-field gel electrophoresis for molecular typing of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. **Diagn Microbiol Infect Dis.** V.69, n.1, p.30-7, 2011.
- CIOFU, O.; MANDSBERG, L.F.; WANG, H.; HØIBY, N. Phenotypes selected during chronic lung infection in cystic fibrosis patients: implications for the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm infections. **FEMS Immunol Med Microbiol.** V.65, n.2, p.215-25, 2012.



CLARRIDGE, J.E.; HARRINGTON, A.T.; ROBERTS, M.C.; SOGE, O.O.; MAQUELIN, K. Impact of strain typing methods on assessment of relationship between paired nares and wound isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **J Clin Microbiol.** V.51, n.1, p.224-31, 2013.

CLSI – CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing – Informational supplement. Approved document M2-A8 and M7-A6. 19. ed., Wayne, Pennsylvania, 2009.

CLSI. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement*. CLSI document M100-S23. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2013.

COELHO, S.M.O.; MORAES, R.A.M.; SOARES, L.C.; PEREIRA, I.A.; GOMES, L.P.; DE SOUZA, M.M.S. Resistance pattern and detection of *mecA* gene in oxacillin-resistant isolates of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus intermedius* from animal and human samples. **Ciência Rural, Santa Maria**, v.37, n.1, p.195-200, 2007.

COELHO, L.R.; SOUZA, R.R.; FERREIRA, F.A.; GUIMARÃES, M.A.; FERREIRA-CARVALHO, B.T.; FIGUEIREDO, A.M. *agr* RNAIII divergently regulates glucose-induced biofilm formation in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. **Microbiology.** V.154, n. Pt 11, p.3480-90, 2008.

COLLIGNON, P.J.; MUNRO, R.; SORRELL, T.C. Systemic sepsis and intravenous devices. A prospective survey. **Med J Aust.** V.141, n.6, p.345-8, 1984.

CORRIGAN, R.M.; RIGBY, D.; HANDLEY, P.; FOSTER, T.J. The role of *Staphylococcus aureus* surface protein SasG in adherence and biofilm formation. **Microbiology.** V.153, n. 8, p.2435-46, 2007.

COSTERTON, J.W. Introduction to biofilm. **Int J Antimicrob Agents.** V.11, n.3-4, p.217-21; discussion 237-9, 1999.

CRAGO, B.; FERRATO, C.; DREWS, S.J.; SVENSON, L.W.; TYRRELL, G.; LOUIE, M. Prevalence of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) in food samples associated with foodborne illness in Alberta, Canada from 2007 to 2010. **Food Microbiol.** V.32, n.1, p.202-5, 2012.

CRAMTON, S.E.; GERKE, C.; SCHNELL, N.F.; NICHOLS, W.W.; GOTZ, F. The intercellular adhesion (*ica*) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. **Infect Immun.** p.675427–33, 1999.

CUCARELLA, C.; SOLANO, C.; VALLE, J.; AMORENA, B.; LASA, I.; PENADÉS, J.R. Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. **J Bacteriol.** V.183, n.9, p.2888-96, 2001.

DE BUYSER, M.L.; DUFOUR, B.; MAIRE, M.; LAFARGE, V. Implication of milk and milk products in food-borne diseases in France and in different industrialized countries. **Int J Food Microbiol.** V.67, n.1-2, p.1-17, 2001.

DELEO, F.R.; OTTO, M.; KREISWIRTH, B.N.; CHAMBERS, H.F. Community associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Lancet.** v.375, p.1557–68, 2010.

DEL VECCHIO, V.G.; PETROZIELLO, J.M.; GRESS, M.J.; MCCLESKEY, F.K.; MELCHER, G.P.; CROUCH, H.K.; LUPSKI, J.R. Molecular genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* via fluorophore-enhanced repetitive-sequence PCR. **J Clin Microbiol.** V.33, n.8, p.2141-4, 1995.

DEPLANO, A.; WITTE, W.; VAN LEEUWEN, W.J.; BRUN, Y.; STRUELENS, M.J. Clonal dissemination of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Belgium and neighboring countries. **Clin Microbiol Infect.** v.6, n.5, p.239-45, 2000a.

DEPLANO, A.; SCHUERMANS, A.; VAN ELDERE, J.; WITTE, W.; MEUGNIER, H.; ETIENNE, J.; GRUNDMANN, H.; JONAS, D.; NOORDHOEK, G.T.; DIJKSTRA, J.; VAN BELKUM, A.; VAN LEEUWEN, W.; TASSIOS, P.T.; LEGAKIS, N.J.; VAN DER ZEE, A.; BERGMANS, A.; BLANC, D.S.; TENOVER, F.C.; COOKSON, B.C.; O'NEIL, G.; STRUELENS, M.J. Multicenter evaluation of epidemiological typing of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains by repetitive-element PCR analysis. The European Study Group on Epidemiological Markers of the ESCMID. **B J Clin Microbiol.** V.38, n.10, p.3527-33, 2000b.

DEPLANO, A.; DE MENDONÇA, R.; DE RYCK, R.; STRUELENS, M.J. External quality assessment of molecular typing of *Staphylococcus aureus* isolates by a network of laboratories. **J Clin Microbiol.** V.44, n.9, p.3236-44, 2006.

DEVA, A.K.; ADAMS, W.P. JR.; VICKERY, K. The role of bacterial biofilms in device-associated infection. **Plast Reconstr Surg.** V.132, n.5, p.1319-28, 2013.

DEVITA, M.D.; WADHERA, R.K.; THEIS, M.L.; INGHAM, S.C. Assessing the potential of *Streptococcus pyogenes* and *Staphylococcus aureus* transfer to foods and customers via a survey of hands, hand-contact surfaces and food-contact surfaces at foodservice facilities. **J Food Serv.** V.18, p.76–79, 2007.

DIBNER, J.J. & RICHARDS, J.D. Antibiotic growth promoters in agriculture: history and mode of action. **Poult Sci.** v.84, n.4, p.634-43, 2005.

DIEKEMA, D.J.; PFALLER, M.A.; SCHMITZ, F.J.; SMAYEVSKY, J.; BELL, J.; JONES, R.N.; BEACH, M. Survey of infections due to *Staphylococcus* species: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pacific region for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999. **Clin Infect Dis.** V.32, p.114-32, 2001.

DINGES, M.M.; ORWIN, P.M.; SCHLIEVERT, P.M. Table of contents. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. **Clin Microbiol Rev.** v.13, n.1, p.16-34, 2000.

DO CARMO, L.S.; CUMMINGS, C.; LINARDI, V.R.; DIAS, R.S.; DE SOUZA, J.M.; DE SENA, M.J.; DOS SANTOS, D.A.; SHUPP, J.W.; PEREIRA, R.K.; JETT, M. A case study of a massive *staphylococcal* food poisoning incident. **Foodborne Pathog Dis.** V.1, n.4, p.241-6, 2004.

DONLAN, R.M. & COSTERTON, J.W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clin. Microbiol. Rev.** v.15, p.167–193, 2002.

DUFOUR, P.; GILLET, Y.; BES, M. Community-acquired methicillin resistant *Staphylococcus aureus* infections in France: emergence of a single clone that produces panton-valentine leukocidin. **Clin Infect Dis.** V.35, p.819–24, 2002.

DUFOUR, P.; JARRAUD, S.; VANDENESCH, F.; GREENLAND, T.; NOVICK, R.P.; BES, M.; ETIENNE, J.; LINA, G. High genetic variability of the *agr* locus in *Staphylococcus* species. **J Bacteriol.** V.184, n.4, p.1180-6, 2002.

DUMONT, A.L.; NYGAARD, T.K.; WATKINS, R.L.; SMITH, A.; KOZHAYA, L.; KREISWIRTH, B.N.; SHOPSIN, B.; UNUTMAZ, D.; VOYICH, J.M.; TORRES, V.J. Characterization of a new cytotoxin that contributes to *Staphylococcus aureus* pathogenesis. **Mol Microbiol.** V.79, n.3, p.814-25, 2011.

DUNMAN, P.M.; MURPHY, E.; HANEY, S.; PALACIOS, D.; TUCKER-KELLOGG, G.; WU, S.; BROWN, E.L.; ZAGURSKY, R.J.; SHLAES, D.; PROJAN, S.J. Transcription profiling-based identification of *Staphylococcus aureus* genes regulated by the *agr* and/or *sarA* loci. **J Bacteriol.** V.18, n.24, p.7341-53, 2001.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA), European Centre for Disease Prevention and Control (2011) The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2009. **EFSA J.** v.9, n.3, p.2090, 2011.

FIGUEROA, G.; NAVARRETE, P.; CARO, M.; TRONCOSO, M.; FAÚNDEZ, G. Carriage of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in food handlers. **Rev Med Chil.** V.130, n. 8, p.859-64, 2002.

FITZPATRICK, F.; HUMPHREYS, H.; O'GARA, J.P. The genetics of staphylococcal biofilm formation--will a greater understanding of pathogenesis lead to better management of device-related infection? **Clin Microbiol Infect.** V.11, n.12, p.967-73, 2005.

FLEISCHER, B. Stimulation of the immune system by microbial superantigens. **Immun Infekt.** V.19, n.1, p.8-11, 1991.

FLUIT, A.C. Livestock associated *Staphylococcus aureus*. **Clin Microbiol Infect.** V.18, n.8, p.735-44, 2012.

FOSTER, T.J. & HÖÖK, M. Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. **Trends Microbiol.** V.6, n.12, p.484-8, 1998.

FOWLER, V.G. JR.; SAKOULAS, G.; MCINTYRE, L.M.; MEKA, V.G.; ARBEIT, R.D.; CABELL, C.H.; STRYJEWSKI, M.E.; ELIOPOULOS, G.M.; RELLER, L.B.; COREY, G.R.; JONES, T.; LUCINDO, N.; YEAMAN, M.R.; BAYER, A.S. Persistent bacteremia due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection is associated with agr dysfunction and low-level in vitro resistance to thrombin-induced platelet microbicidal protein. **J Infect Dis.** V.190, n.6, p.1140-9, 2004.

FREDERIX, M. & DOWNIE, A.J. Quorum sensing: regulating the regulators. **Adv Microb Physiol.** V.58, p.23-80, 2011.

GAGNAIRE, J.; DAUWALDER, O.; BOISSET, S.; KHAU, D.; FREYDIÈRE, A.M.; ADER, F.; BES, M.; LINA, G.; TRISTAN, A.; REVERDY, M.E.; MARCHAND, A.; GEISSMANN, T.; BENITO, Y.; DURAND, G.; CHARRIER, J.P.; ETIENNE, J.; WELKER, M.; VAN BELKUM, A.; VANDENESCH, F. Detection of *Staphylococcus aureus* delta-toxin production by whole-cell MALDI-TOF mass spectrometry, **PLoS One.** V.7, n.7, p.e40660, 2012.

GALES, A.C.; SADER, H.S.; RIBEIRO, J.; ZOCCOLI, C.; BARTH, A.; PIGNATARI, A.C. Antimicrobial susceptibility of gram-positive bacteria isolated in Brazilian hospitals participating in the SENTRY Program (2005-2008). **Braz J Infect Dis.** V.13, n.2, p.90-8, 2009.

GEOGHEGAN J.A.; CORRIGAN, R.M.; GRUSZKA, D.T.; SPEZIALE, P.; O'GARA, J.P. Role of surface protein SasG in biofilm formation by *Staphylococcus aureus*. **J Bacteriol.** V.192, p.5663-5673, 2010.

GIAOURIS, E.; HEIR, E.; HÉBRAUD, M.; CHORIANOPOULOS, N.; LANGSRUD, S.; MØRETRØ, T.; HABIMANA, O.; DESVAUX, M.; RENIER, S.; NYCHAS, G.J. Attachment and biofilm formation by foodborne bacteria in meat processing environments: Causes, implications, role of bacterial interactions and control by alternative novel methods. **Meat Sci.** v.S0309-1740, n.13, p.00217-9, 2013.

GILLASPY, A.F.; HICKMON, S.G.; SKINNER, R.A.; THOMAS, J.R.; NELSON, C.L.; SMELTZER, M.S. Role of the accessory gene regulator (*agr*) in pathogenesis of *staphylococcal* osteomyelitis. **Infect Immun.** v.63, n.9, p.3373-80, 1995.

GILBERT, P.; ALLISON, D. G.; MCBAIN, A. J. Biofilms *in vitro* and *in vivo*: do singular mechanisms imply cross-resistance? **J. Appl. Microbiol.** V.92, p.S98–S110, 2002.

GILLET, Y.; ISSARTEL, B.; VANHEMS, P.; FOURNET, J.C.; LINA, G.; BES, M.; VANDENESCH, F.; PIÉMONT, Y.; BROUSSE, N.; FLORET, D.; ETIENNE, J. Association between *Staphylococcus aureus* strains carrying gene for Panton-Valentine leukocidin and highly lethal necrotising pneumonia in young immunocompetent patients. **Lancet.** V.359, n.9308, p.753-9, 2002.

GILOT, P. & VAN LEEUWEN J. W. Comparative Analysis of *agr* Locus Diversification and Overall Genetic Variability among Bovine and Human *Staphylococcus aureus* isolates **Clin. Microbiol.** V.42, n.3, p.1265, 2004.

GOERKE, C.; CAMPANA, S.; BAYER, M.G.; DÖRING, G.; BOTZENHART, K.; WOLZ, C. Direct quantitative transcript analysis of the *agr* regulon of *Staphylococcus aureus* during human infection in comparison to the expression profile *in vitro*. **Infect Immun.** v.68, n.3, p.1304-11, 2000.

GOERKE, C.; KÜMMEL, M.; DIETZ, K.; WOLZ, C. Evaluation of intraspecies interference due to *agr* polymorphism in *Staphylococcus aureus* during infection and colonization. **J Infect Dis.** V.188, n.2, p.250-6, 2003.

GOERKE, C. & WOLZ, C. Regulatory and genomic plasticity of *Staphylococcus aureus* during persistent colonization and infection. **Int. J. Med. Microbiol.** v.294, p.195–202, 2004.

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

GONTANG, E.A., FENICAL, W. & JENSEN P.R. Phylogenetic Diversity of Gram-Positive Bacteria Cultured from Marine Sediments. **Appl Environ Microbiol**, United States, v.73, p.3272-3282, 2007.

GORWITZ, R.J.; KRUSZON-MORAN, D.; MCALLISTER, S.K.; MCQUILLAN, G.; MCDOUGAL, L.K.; FOSHEIM, G.E.; JENSEN, B.J.; KILLGORE, G.; TENOVER, F.C.; KUEHNERT, M.J. Changes in the prevalence of nasal colonization with *Staphylococcus aureus* in the United States, 2001-2004. **J Infect Dis.** v.197, n.9, p.1226-34, 2008.

GÖTZ, F.; HEILMANN, C.; CRAMTON, S.E. Molecular basis of catheter associated infections by staphylococci. **Adv Exp Med Biol.** v.485, p.103-11, 2000.

GOTZ, F. An excellent review of staphylococcal biofilms and the molecular mechanisms of adhesion and biofilm development in staphylococci. *Staphylococcus* and biofilms. **Mol. Microbiol.** V.43, n.1367–1378, 2002.

GRANDO, W.F.; SCAPIN, D.; MALHEIROS, P.S.; ROSSI, E.M.; TONDO, E.C.. Suscetibilidade a antimicrobianos de *Staphylococcus aureus* isolados de manipuladores de indústria de laticínios. **Alim. Nutr.** v.19, n.4, p. 467-471, 2008.

GRAVELAND, H.; DUIM, B.; VAN DUIJKEREN, E.; HEEDERIK, D.; WAGENAAR, J.A. Livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in animals and humans. **Int J Med Microbiol.** v.301, n.8, p.630-4, 2011.

GREIG, J.D. & RAVEL, A. Analysis of foodborne outbreak data reported internationally for source attribution. **Int J Food Microbiol.** V.130, n.2, p.77-87, 2009.

GRUMANN, D.; NÜBEL, U.; BRÖKER, B.M. *Staphylococcus aureus* toxins - Their functions and genetics. **Infect Genet Evol.** V.1348, n.13, p.S1567-00086-5, 2013.

GRUNDMANN, H.; HORI, S.; ENRIGHT, M.C.; WEBSTER, C.; TAMI, A.; FEIL, E.J.; PITT, T. Determining the genetic structure of the natural population of *Staphylococcus aureus*: a comparison of multilocus sequence typing with pulsed-field gel electrophoresis, randomly amplified polymorphic DNA analysis, and phage typing. **J Clin Microbiol.** V.40, n.12, p.4544-6, 2002.

GUNDOGAN, N.; CITAK, S.; YUCEL, N.; DEVREN, A. A note on the incidence and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from meat and chicken samples. **Meat Sci.** v.69, n.4, p.807-10, 2005.

GUTIÉRREZ, D.; DELGADO, S.; VÁZQUEZ-SÁNCHEZ, D.; MARTÍNEZ, B.; CABO, M.L.; RODRÍGUEZ, A.; HERRERA, J.J.; GARCÍA, P. Incidence of *Staphylococcus aureus* and analysis of associated bacterial communities on food industry surfaces. **Appl Environ Microbiol.** v.78, n.24, p.8547-54, 2012.

HALL-STOODLEY, L.; COSTERTON, J.W.; STOODLEY, P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. **Nat Rev Microbiol.** V.2, n.2, p.95-108, 2004.

HANNING, I., GILMORE, D.; PENDLETON, S.; FLECK, S.; CLEMENT, A.; PARK, S.H.; SCOTT, E.; RICKE, S.T. Characterization of *Staphylococcus aureus* Isolates from Retail Chicken Carcasses and Pet Workers in Northwest **Arkansas Journal of Food Protection**, Vol. 75, n. 1, 2012.

HARAN, K.P.; GODDEN, S.M.; BOXRUD, D.; JAWAHIR, S.; BENDER, J.B.; SREEVATSAN, S. Prevalence and characterization of *Staphylococcus aureus*, including methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, isolated from bulk tank milk from Minnesota dairy farms. **J Clin Microbiol.** V.50, n.3, p.688-95, 2012.

HARTMAN, B. & TOMASZ, A. Altered penicillin-binding proteins in methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob Agents Chemother.** V.19, n.5, p.726-35, 1981.

HARTSTEIN, A.I.; LEMONTE, A.M.; IWAMOTO, P.K. DNA typing and control of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at two affiliated hospitals. **Infect Control Hosp Epidemiol.** V.18, n.1, p.42-8, 1997.

HEILMANN, C.; HARTLEIB, J.; HUSSAIN, M. S.; PETERS, G. The multifunctional *Staphylococcus aureus* autolysin aaa mediates adherence to immobilized fibrinogen and fibronectin. **Infect. Immun.** v.73, p.4793–4802, 2005.

HENNEKINNE, J.A.; DE BUYSER, M.L.; DRAGACCI, S. *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. **FEMS Microbiol Rev.** n.36, v.4, p.815-36, 2012.

HERRMANN, M.; VAUDAUX, P. E.; PITTET, D.; AUCKENTHALER, R.; LEW, P. D.; SCHUMACHER-PERDREAU, F.; PETERS, G.; WALDVOGEL, F. A. Fibronectin, fibrinogen, and laminin act as mediators of adherence of clinical staphylococcal isolates to foreign material. **J. Infect. Dis.** V.158, p.693–701, 1988.

HO, C.M.; HO, M.W.; LI, C.Y.; LU, J.J. Fine typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates using direct repeat unit and staphylococcal interspersed repeat unit typing methods. **J Microbiol Immunol Infect.** v.S1684-1182, n. 13, p.00166-7, 2013.

HOLMBERG, S.D. & BLAKE, P.A. *Staphylococcal* food poisoning in the United States. New facts and old misconceptions. **JAMA.** V.251, n.4, p.487-9, 1984.

HOLTFRETER, S.; GRUMANN, D.; SCHMUDDE, M.; NGUYEN, H.T.; EICHLER, P.; STROMMINGER, B.; KOPRON, K.; KOLATA, J.; GIEDRYS-KALEMBA, S.; STEINMETZ, I.; WITTE, W.; BRÖKER, B.M. Clonal distribution of superantigen genes in clinical *Staphylococcus aureus* isolates. **J Clin Microbiol.** V.45, n.8, p.2669-80, 2007.

HOLZINGER, D.; GIELDON, L.; MYSORE, V.; NIPPE, N.; TAXMAN, D.J.; DUNCAN, J.A.; BROGLIE, P.M.; MARKETON, K.; AUSTERMANN, J.; VOGL, T.; FOELL, D.; NIEMANN, S.; PETERS, G.; ROTH, J.; LÖFFLER, B.

*Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin induces an inflammatory response in human phagocytes via the NLRP3 inflammasome. **J Leukoc Biol.** V.92, n.5, p.1069-81, 2012.

HU J, MA XX, TIAN Y, PANG L, CUI LZ, SHANG H. Reduced vancomycin susceptibility found in methicillin-resistant and methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* clinical isolates in Northeast China. **PLoS One.** V.8, n.9, p.e73300, 2013.

ALEXANDROS IKONOMIDIS A,\*, AFRODITI VASDEKI A, IOULIA KRISTO A, ANTONIOS N. MANIATIS A, ATHANASSIOS TSAKRIS C, KONSTANTINOS N. MALIZOS B, SPYROS POURNARAS A. Association of biofilm formation and methicillin-resistance with accessory gene regulator (agr) loci in Greek *Staphylococcus aureus* clones. **Microbial Pathogenesis.** p.341–344, 2009.

IANDOLO, J.J. Genetic analysis of extracellular toxins of *Staphylococcus aureus*. **Annu Rev Microbiol.** V.43, p.375-402, 1989.

IZANO, E.A.; AMARANTE, M.A.; KHER, W.B.; KAPLAN, J.B. Differential roles of poly- N-acetylglucosamine surface polysaccharide and extracellular DNA in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. **Appl Environ Microbiol.** V.74, p.470–476, 2008.

JARRAUD, S.; LYON, G.J.; FIGUEIREDO, A.M.; LINA, G.; VANDENESCH, F.; ETIENNE, J.; MUIR, T.W.; NOVICK, R.P. Exfoliatin-producing strains define a fourth agr specificity group in *Staphylococcus aureus*. **J Bacteriol.** V.182, n.22, p.6517-22, 2000.

JABBARI, S.; KING, J.R.; WILLIAMS, P. Cross-strain quorum sensing inhibition by *Staphylococcus aureus*. Part 1: A spatially homogeneous model. **Bull Math Biol.** V.74, n.6, p.1292-325, 2012.

JARRAUD, S.; MOUGEL, C.; THIOULOUSE, J.; LINA, G.; MEUGNIER, H.; FOREY, F.; NESME, X.; ETIENNE, J.; VANDENESCH, F. Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, agr groups (alleles), and human disease. **Infect Immun.** v.70, n.2, p.631-41, 2002.

JANZON, L.; LÖFDAHL, S.; ARVIDSON S. Identification and nucleotide sequence of the delta-lysin gene, hld, adjacent to the accessory gene regulator (agr) of *Staphylococcus aureus*, **Mol Gen Genet.** V.219, n.3, p.480-5, 1989.

JESSEN, B. & LAMMERT, L. Biofilm and disinfection in meat processing plants. **International Biodeterioration and Biodegradation.** V.51, n.4, p.265–279, 2003.

JEVONS, M.P.; COE, A.W.; PARKER, M.T. Methicillin resistance in *staphylococci*. **Lancet.** V.1, n.7287, p.904-7, 1963.



JI, G.; BEAVIS, R.; NOVICK, R.P. Bacterial interference caused by autoinducing peptide variants. **Science**. V.276, n.5321, p.2027-30, 1997.

JO, C.; YOO, J.I.; YOO, J.S.; CHUNG, H.S.; PARK, S.H.; KIM, H.S.; LEE, Y.S.; CHUNG, G.T. Investigation of Biofilm Formation and its Association with the Molecular and Clinical Characteristics of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Osong Public Health Res Perspect**. v.4, n.5, p.225-32, 2013.

JOO, H.S.; OTTO, M. Molecular basis of in vivo biofilm formation by bacterial pathogens. **Chem Biol**. V.19, n.12, p.1503-13, 2012.

JORDÁ, G.B.; MARUCCI, R.S.; GUIDA, A.M.; PIRES, P.S.; MANFREDI, E.A. Carriage and characterization of *Staphylococcus aureus* in food handlers. **Rev Argent Microbiol**. V.44, n.2, p.101-4, 2012.

KALLEN, A.J.; HAGEMAN, J.; GORWITZ, R.; BEEKMANN, S.E.; POLGREEN, P.M. Characteristics of *Staphylococcus aureus* community-acquired pneumonia during the 2006-2007 influenza season. **Clin Infect Dis**. v.45, n.12, p.1655, 2007.

KAMAREHEI, F.; GHAEMI, E.A.; DADGAR, T. Prevalence of enterotoxin a and b genes in *Staphylococcus aureus* isolated from clinical samples and healthy carriers in Gorgan City, North of Iran. **Indian J Pathol Microbiol**. v.56, n.3, p.265-8, 2013.

KATAYAMA, Y.; ITO, T.; HIRAMATSU, K. A new class of genetic element, staphylococcus cassette chromosome mec, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob Agents Chemother**. V.44, n.6, p.1549-55, 2000.

KAWAMURA, H.; NISHI, J.; IMUTA, N.; TOKUDA, K.; MIYANOHARA, H.; HASHIGUCHI, T.; ZENMYO, M.; YAMAMOTO, T.; IJIRI, K.; KAWANO, Y.; KOMIYA, S. Quantitative analysis of biofilm formation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains from patients with orthopaedic device-related infections. **FEMS Immunol Med Microbiol**. v.63, n.1, p.10-5, 2011

KEBAIER, C.; CHAMBERLAND, R.R.; ALLEN, I.C.; GAO, X.; BROGLIE, P.M.; HALL, J.D.; JANIA, C.; DOERSCHUK, C.M.; TILLEY, S.L.; DUNCAN, J.A. *Staphylococcus aureus*  $\alpha$ -hemolysin mediates virulence in a murine model of severe pneumonia through activation of the NLRP3 inflammasome. **J Infect Dis**. V.205, n.5, p.807-17, 2012.

KECHRID A, PÉREZ-VÁZQUEZ M, SMAOUI H, HARIGA D, RODRÍGUEZ-BAÑOS M, VINDEL A, BAQUERO F, CANTÓN R, DEL CAMPO R. Molecular analysis of community-acquired methicillin-susceptible and resistant *Staphylococcus aureus* isolates recovered from bacteraemic and osteomyelitis infections in children from Tunisia. **Clin Microbiol Infect**. V.17, 7):1020-6, 2011.

- KEROUANTON, A.; HENNEKINNE, J.A.; LETERTRE, C.; PETIT, L.; CHESNEAU, O.; BRISABOIS, A.; DE BUYSER, M.L. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains associated with food poisoning outbreaks in France. **Int J Food Microbiol.** v.115, p.369–375, 2007.
- KHAN, S.A.; NAWAZ, M.S.; KHAN, A.A.; CERNIGLIA, C.E. Transfer of erythromycin resistance from poultry to human clinical strains of *Staphylococcus aureus*. **J Clin Microbiol.** V.38, n.5, p.1832-8, 2000.
- KITAI, S.; SHIMIZU, A.; KAWANO, J.; SATO, E.; NAKANO, C.; UJI, T.; KITAGAWA, H. Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from retail raw chicken meat in Japan. **J Vet Med Sci.** v.67, n.1, p.107-10, 2005.
- KLUYTMANS, J.; VAN BELKUM, A.; VERBRUGH, H. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. **Clin Microbiol Rev.** v.10, n.3, p.505-20, 1997.
- KNOBLOCH, J.K.; HORSTKOTTE, M.A.; ROHDE, H.; MACK D. Evaluation of different detection methods of biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. **Med Microbiol Immunol.** V.191, n.2, p.101-6, 2002.
- KUEHNERT, M.J.; KRUSZON-MORAN, D.; HILL, H.A.; MCQUILLAN, G.; MCALLISTER, S.K.; FOSHEIM, G.; MCDUGAL, L.K.; CHAITRAM, J.; JENSEN, B.; FRIDKIN, S.K.; KILLGORE, G.; TENOVER, F.C. Prevalence of *Staphylococcus aureus* nasal colonization in the United States, 2001-2002. **J Infect Dis.** V.193, n.2, p.172-9, 2006.
- KURODA, M.; ITO, R.; TANAKA, Y.; YAO, M.; MATOBA, K.; SAITO, S.; TANAKA, I.; OHTA, T. *Staphylococcus aureus* surface protein SasG contributes to intercellular autoaggregation of *Staphylococcus aureus*. **Biochem Biophys Res Commun.** V.377, n.4, p.1102-6, 2008.
- LAMBE, D.W. JR.; FERGUSON, K.P.; MAYBERRY-CARSON, K.J.; TOBERMEYER, B.; COSTERTON, J.W. Foreign-body-associated experimental osteomyelitis induced with *Bacteroides fragilis* and *Staphylococcus epidermidis* in rabbits. **Clin Orthop Relat Res.** v.266, p.285-94, 1991.
- LE LOIR, Y.; BARON, F.; GAUTIER, M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. **Genet Mol Res.** V.2, n.1, p.63-76, 2003.
- LEID, J.G.; SHIRTLIFF, M.E.; COSTERTON, J.W.; STOODLEY, A.P. Human leukocytes adhere to, penetrate, and respond to *Staphylococcus aureus* biofilms. **Infect Immun.**v.70, n.6339–6345, 2002.
- LI, H.; LLERA, A.; MALCHIODI, E.L.; MARIUZZA, R.A. The structural basis of T cell activation by superantigens. **Annu Rev Immunol.** V.17, n.435–466, 1999.

- LIMA, G.C.; LOIKO, M.R.; CASARIN, L.S.; TONDO, E.C. Assessing the epidemiological data of *Staphylococcus aureus* food poisoning occurred in the State of Rio Grande do Sul, Southern Brazil. *Braz J Microbiol.* V.44, n.3, p.759-63, 2013.
- LINA, G. Y.; GILLET, F.; VANDENESCH, M. E.; JONES, D.; FLORET, ETIENNE, J. Toxin involvement in staphylococcal scalded skin syndrome. **Clin. Infect. Dis.** V.25, p.1369–1373, 1997.
- LINA, G.; BOHACH, G.A.; NAIR, S.P.; HIRAMATSU, K.; JOUVIN-MARCHE, E.; MARIUZZA, R. Standard nomenclature for the superantigens expressed by *Staphylococcus*. **J Infect Dis**, v.189, p.2334–2336, 2004.
- LOETO, D.; MATSHEKA, M.I.; GASHE, B.A. Enterotoxigenic and antibiotic resistance determination of *Staphylococcus aureus* strains isolated from food handlers in Gaborone, Botswana. **J Food Prot.** V.70, n.12, p.2764-8, 2007 .
- LOWY, F.D. *Staphylococcus aureus* infections. **N Engl J Med.**v.339, p.520–32, 1998.
- LUTZ, L. & BARTH, A.L. Susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates to vancomycin at a university hospital in southern Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology.** V.37, p.244-246, 2006.
- LYON, G.J.; NOVICK, R.P. Peptide signaling in *Staphylococcus aureus* and other Gram-positive bacteria. **Peptides.**V.25, n.9, p.1389-403, 2004.
- MA, X.X.; WANG, E.H.; LIU, Y.; LUO, E.J. Antibiotic susceptibility of coagulase-negative staphylococci (CoNS): emergence of teicoplanin-non-susceptible CoNS strains with inducible resistance to vancomycin. **J Med Microbiol.** v.60, p.1661-8, 2011.
- MACK, D.; ROHDE, H.; HARRIS, L.G.; DAVIES, A.P.; HORSTKOTTE, M.A.; KNOBLOCH, J.K. Biofilm formation in medical device-related infection. **Int J Artif Organs.** V.4, p.343-59, 2006.
- MAH, T. F. & O'TOOLE, G. A. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. **Trends Microbiol.** V.9, p.34–39, 2001.
- MAIRA-LITRÁN, T.; KROPEC, A.; ABEYGUNAWARDANA, C.; JOYCE, J.; MARK, G. 3RD; GOLDMANN, D.A.; PIER, G.B. Immunochemical properties of the staphylococcal poly-N-acetylglucosamine surface polysaccharide. **Infect Immun.** V.70, n.8, p.4433-40, 2002.
- MAKI, D. G.; WEISE, C. E; SARAFIN, H. W. A semiquantitative culture method for identifying intravenous-catheter-related infection. **N. Engl. J. Med.** V.296, p.1305-1309, 1977.

MANN, E.E.; RICE, K.C.; BOLES, B.R.; ENDRES, J.L.; RANJIT, D. Modulation of eDNA release and degradation affects *Staphylococcus aureus* biofilm maturation. **PLoS ONE**. V.4, p.e5822, 2009.

MARRACK, P. & KAPPLER J. The staphylococcal enterotoxins and their relatives. **Science**. V.248, n.4959, p.1066, 1990.

MASIUK, H.; KOPRON, K.; GRUMANN, D.; GOERKE, C.; KOLATA, J.; JURSA-KULESZA, J.; GIEDRYS-KALEMBA, S.; BRÖKER, B.M.; HOLTFRETER, S. Association of recurrent furunculosis with Panton-Valentine leukocidin and the genetic background of *Staphylococcus aureus*. **J Clin Microbiol**. V.48, n.5, p.1527-35, 2010.

MARINO, M.; FRIGO, F.; BARTOLOMEOLI, I.; MAIFRENI, M. Safety-related properties of *staphylococci* isolated from food and food environments. **J Appl Microbiol**. v.110, n.2, p.550-61, 2011.

MARTINS, P.D.; DE ALMEIDA, T.T.; BASSO, A.P.; DE MOURA, T.M.; FRAZZON, J.; TONDO, E.C.; FRAZZON, A.P. Coagulase-positive *staphylococci* isolated from chicken meat: pathogenic potential and vancomycin resistance. **Foodborne Pathog Dis**. V.10, n.9, p.771-6, 2013.

MAZMANIAN, S.K.; TON-THAT, H.; SCHNEEWIND, O. Sortase-catalysed anchoring of surface proteins to the cell wall of *Staphylococcus aureus*. **Mol Microbiol**. V.40, n.5, p.1049-57, 2001.

MCDUGALD, D.; RICE, S.A.; BARRAUD, N.; STEINBERG, P.D.; KJELLEBERG, S. Should we stay or should we go: mechanisms and ecological consequences for biofilm dispersal. **Nat Rev Microbiol**. V.10, n.1, p.39-50, 2011.

MEAD, P.S.; SLUTSKER, L.; DIETZ, V.; MCCAIG, L.F.; BRESEE, J.S.; SHAPIRO, C.; GRIFFIN, P.M.; TAUXE, R.V. Food-related illness and death in the United States. **Emerg Infect Dis**. V.5, n.5, p.607-25, 1999.

MERINO, N.; TOLEDO-ARANA, A.; VERGARA-IRIGARAY, M.; VALLE, J.; SOLANO, C. Protein A-mediated multicellular behavior in *Staphylococcus aureus*. **J Bacteriol**. V.191, p.832–843, 2009.

MERMEL, L.A.; FARR, B.M.; SHERERTZ, R.J.; RAAD, II.; O'GRADY, N.; HARRIS, J.S.; CRAVEN, D.E. Guidelines for the management of intravascular catheter-related infections. Infectious Diseases Society of America; American College of Critical Care Medicine; Society for Healthcare Epidemiology of America. **Infect Control Hosp Epidemiol**. V.22, n.4, p.222-42, 2001.

MERTENS, A.; GHEBREMEDHIN, B. Genetic determinants and biofilm

formation of clinical *Staphylococcus epidermidis* isolates from blood cultures and indwelling devices. **Eur J Microbiol Immunol** v.3, n. 2, p.111-9, 2013.

MOISE-BRODER, P.A.; SAKOULAS, G.; ELIOPOULOS, G.M.; SCHENTAG, J.J.; FORREST, A.; MOELLERING, R.C. JR. Accessory gene regulator group II polymorphism in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* is predictive of failure of vancomycin therapy. **Clin Infect Dis**. V.38, n.12, p.1700-5, 2004.

MONECKE, S.; LUEDICKE, C.; SLICKERS, P.; EHRLICH, R. Molecular epidemiology of *Staphylococcus aureus* in asymptomatic carriers. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**. V.28, n.9, p.1159-65, 2009.

MOORE, P.C. & LINDSAY, J.A. Genetic variation among hospital isolates of methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*: evidence for horizontal transfer of virulence genes. **J Clin Microbiol**. V.39, n.8, p.2760-7, 2001.

MONK, A.B.; BOUNDY, S.; CHU, V.H.; BETTINGER, J.C.; ROBLES, JR.; FOWLER, V.G. JR.; ARCHER, G.L. Analysis of the genotype and virulence of *Staphylococcus epidermidis* isolates from patients with infective endocarditis. **Infect Immun**. V.76, n.11, p.5127-32, 2008.

MONTANARO, L.; SPEZIALE, P.; CAMPOCCIA, D.; PIRINI, V.; RAVAIOLI, S.; CANGINI, I.; VISAI, L.; ARCIOLA, C.R. Polymorphisms of agr locus correspond to distinct genetic patterns of virulence in *Staphylococcus aureus* clinical isolates from orthopedic implant infections. **J Biomed Mater Res A**. v.94, n.3, p.825-32, 2010.

MORANDI, S.; BRASCA, M.; LODI, R.; CREMONESI, P.; CASTIGLIONI, B. Detection of classical enterotoxins and identification of enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* from milk and dairy products. **Vet Microbiol**. V.124, n.1-2, p.66-7, 2007.

MORFELDT, E.; TEGMARK, K.; ARVIDSON, S. Transcriptional control of the agr-dependent virulence gene regulator, RNAIII, in *Staphylococcus aureus*. **Mol. Microbiol**. V.21, p.1227-1237, 1996.

MOURA, T.M.; CAMPOS, F.S.; D'AZEVEDO, P.A.; VAN DER SAND, S.T.; FRANCO, A.C.; FRAZZON, J.; FRAZZON, A.P. Prevalence of enterotoxin-encoding genes and antimicrobial resistance in coagulase-negative and coagulase-positive *Staphylococcus* isolates from black pudding. **Rev Soc Bras Med Trop**. V.45, n.5, p.579-85, 2012.

MONTESINOS, I.; SALIDO, E.; DELGADO, T.; CUERVO, M.; SIERRA, A. Epidemiologic genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis at a university hospital and comparison with antibiotyping and protein A and coagulase gene polymorphisms. **J Clin Microbiol**. V.40, n.6, p.2119-25, 2005.

NAGASE, N.; SASAKI, A.; YAMASHITA, K.; SHIMIZU, A.; WAKITA, Y.; KITAI, S.; KAWANO, J. Isolation and species distribution of staphylococci from animal and human skin. **J. Vet. Med. Sci.** v.64, p.245–250, 2002.

NAVARRE, W. W. & SCHNEEWIND, O. Surface proteins of Gram positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. **Microbiol Mol Biol Rev.** v.63, p.174–229, 1999.

NICOLETTI G. & STEFANI S. agr-Genotyping and transcriptional analysis of biofilm-producing *Staphylococcus aureus*. **FEMS Immunol Med Microbiol.** V.51, n.1, p.220-7, 2007.

NORMANNO, G.; FIRINU, A.; VIRGILIO, S.; MULA, G.; DAMBROSIO, A.; POGGIU, A.; DECASTELLI, L.; MIONI, R.; SCUOTA, S.; BOLZONI, G.; DI GIANNATALE, E.; SALINETTI, A.P.; LA SALANDRA, G.; BARTOLI, M.; ZUCCON, F.; PIRINO, T.; SIAS, S.; PARISI, A.; QUAGLIA, N.C.; CELANO, G.V. Coagulase-positive Staphylococci and *Staphylococcus aureus* in food products marketed in Italy. **Int J Food Microbiol.** V.98, n.1, p.73-9, 2005.

NOTERMANS.; S.; & KAMPELCHER, E.H. Attachment of some strains to the skin of broiler chickens. **Br. Poultry Sci.** 15, 573-585, 1984.

NOVICK, R.P.; ROSS, H.F.; PROJAN, S.J.; KORNBLUM, J.; KREISWIRTH, B.; MOGHAZEH, S. Synthesis of staphylococcal virulence factors is controlled by a regulatory RNA molecule **The EMBO Journal.** v.12, n.10, p.3967-3975, 1993.

NOVICK, R.P. Autoinduction and signal transduction in the regulation of *staphylococcal* virulence. **Mol Microbiol.** V.48, n.6, p.1429-49, 2003.

NOVICK, R.P. & GEISINGER, E. Quorum sensing in *staphylococci*. **Annu Rev Genet.** V.42, p.541-64, 2008.

O'GARA J.P. Ica and beyond: biofilm mechanisms and regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. **FEMS Microbiol Lett.** v.270, n.2, p.179-88, 2007.

OMOE, K.; IMANISHI, K.; HU, D.L. Characterization of novel staphylococcal enterotoxin-like toxin type P. **Infect Immun.** v.73, p.5540–5546, 2005.

O'NEILL, E.; POZZI, C.; HOUSTON, P.; SMYTH, D.; HUMPHREYS, H.; ROBINSON, D.A.; O'GARA, J.P. Association between methicillin susceptibility and biofilm regulation in *Staphylococcus aureus* isolates from device-related infections. **J Clin Microbiol.** v.45, n.5, p.1379-88, 2007.

ONO, H.K.; OMOE, K.; IMANISHI, K.; IWAKABE, Y.; HU, D.L.; KATO, H.; SAITO, N.; NAKANE, A.; UCHIYAMA, T.; SHINAGAWA, K. Identification and characterization of two novel staphylococcal enterotoxins, types S and T. **Infect Immun.** v.76, n.11, p.4999-5005, 2008.

OTTO, M. Basis of virulence in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Annu Rev Microbiol.** V.64, p.143–62, 2010.

OTTO, M. Staphylococcal infections: mechanisms of biofilm maturation and detachment as critical determinants of pathogenicity. **Annu Rev Med.** V.64, p.175-88, 2013.

PANTOSTI, A. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Associated with Animals and Its Relevance to Human Health. **Front Microbiol.** V.9, n.3, p.127, 2012.

PARK, K.H.; LEE, Y.M.; HONG, H.L.; KIM, T.; PARK, H.J.; PARK, S.Y.; MOON, S.M.; CHONG, Y.P.; KIM, S.H.; LEE, S.O.; CHOI, S.H.; JEONG, J.Y.; KIM, M.N.; WOO, J.H.; KIM, Y.S. Persistent catheter-related *Staphylococcus aureus* bacteremia after catheter removal and initiation of antimicrobial therapy. **PLoS One.** V.7, n.10, p.e46389, 2012.

PATEL R. Biofilms and antimicrobial resistance. **Clin Orthop Relat Res.** p.41–47, 2005.

PAVITHRA, D. & DOBLE, M. Biofilm formation, bacterial adhesion and host response on polymeric implants issues and prevention. **Biomed Mater.** v.3, n.3, p.034003, 2008.

PEACOCK S.J.; MOORE, C.E.; JUSTICE, A.; KANTZANOU, M.; STORY, L.; MACKIE, K.; O'NEILL, G.; DAY, N.P. Virulent combinations of adhesin and toxin genes in natural populations of *Staphylococcus aureus*. **Infect Immun.** V.70, p.9, v.4987-96, 2002.

PERIASAMY, S.; CHATTERJEE, S.S.; CHEUNG, G.Y.; OTTO, M. Phenol-soluble modulins in staphylococci: What are they originally for? **Commun Integr Biol.** v.5, n.3, p.275-7, 2012.

PEREIRA, V.; LOPES, C.; CASTRO, A.; SILVA, J.; GIBBS, P.; TEIXEIRA, P. Characterization for enterotoxin production, virulence factors, and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from various foods in Portugal. **Food Microbiol.** V.26, n.3, p.278-82, 2009.

PERRET M, BADIOU C, LINA G, BURBAUD S, BENITO Y, BES M, COTTIN V, COUZON F, JURUJ C, DAUWALDER O, GOUTAGNY N, DIEP BA, VANDENESCH F, HENRY T. Cross-talk between *Staphylococcus aureus* leukocidins-intoxicated macrophages and lung epithelial cells triggers chemokine secretion in an inflammasome-dependent manner. **Cell Microbiol.** V. 14, n.7, p.1019-36, 2012.

Peton, V.; Le Loir, Y. *Staphylococcus aureus* in veterinary medicine. **Infect Genet Evol.** V.1348, n.13, p.00307-9, 2013.

POINDEXTER, N.J. & SCHLIEVERT, P.M. Suppression of immunoglobulin-secreting cells from human peripheral blood by toxic-shock-syndrome toxin-1. **J Infect Dis.** V.153, n.4, p.772-9, 1986.

PU, S.; WANG, F.; GE, B. Characterization of toxin genes and antimicrobial Susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from Louisiana retail meats. **Foodborne Pathog Dis.** V.8, n.2, p.299-306, 2011.

PUMPHREY, N.; VUIDEPOT, A.; JAKOBSEN, B.; FORSBERG, G.; WALSE, B.; LINDKVIST-PETERSSON, K. Cutting edge: evidence of direct TCR alphachain interaction with superantigen. **J Immunol.** v.179, p.2700–2704, 2007.

RALL, V.L.; VIEIRA, F.P.; RALL, R.; VIEITIS, R.L.; FERNANDES, A. JR.; CANDEIAS, J.M.; CARDOSO, K.F.; ARAÚJO, J.P. JR. PCR detection of staphylococcal enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw and pasteurized milk. **Vet Microbiol.** V.132, n.3-4, p.408-13, 2008.

PARAMESWARAN, R.; SHERCHAN, J.B.; D, M.V.; MUKHOPADHYAY, C.; VIDYASAGAR, S. Intravascular catheter-related infections in an Indian tertiary care hospital **J Infect Dev Ctries.** V.5, n.6, p.452-458, 2011.

REITER, K.C.; DA SILVA PAIM, T.G.; DE OLIVEIRA, C.F.; D'AZEVEDO, P.A. High biofilm production by invasive multiresistant *staphylococci*. **APMIS.** V. 119, n.11, p.776-81, 2011.

REITER, K.C.; VILLA, B.; DA SILVA PAIM, T.G.; SAMBRANO, G.E.; DE OLIVEIRA, C.F.; D'AZEVEDO, P.A. Enhancement of antistaphylococcal activities of six antimicrobials against sasG-negative methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*: an in vitro biofilm model. **Diagn Microbiol Infect Dis.** V.74, n.2, p.101-5, 2012.

RIBEIRO, A.; CORONADO, A.Z.; SILVA-CARVALHO, M.C.; FERREIRA CARVALHO, B.T.; DIAS, C.; ROZENBAUM, R.; DEL PELOSO, P.F.; DA COSTA FERREIRA LEITE C.; TEIXEIRA, L.A.; FIGUEIREDO, A.M. Detection and characterization of international community-acquired infections by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Rio de Janeiro and Porto Alegre cities causing both community- and hospital-associated diseases. **Diagn Microbiol Infect Dis.** V.59, n.3, p.339-45, 2007.

RIBEIRO, A.; DIAS, C.; SILVA-CARVALHO, M.C.; BERQUÓ, L.; FERREIRA, F.A.; SANTOS, R.N.; FERREIRA-CARVALHO, B.T.; FIGUEIREDO, A.M. First report of infection with community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in South America. **J Clin Microbiol.** V.43, n.4, p.1985-8, 2005.

RIZEK, C.F.; MATTÉ, M.H.; DROPA, M.; MAMIZUKA, E.M.; DE ALMEIDA, L.M.; LINCOPAN, N.; MATTÉ, G.R.; GERMANO, P.M. Identification of



*Staphylococcus aureus* carrying the *mecA* gene in ready-to-eat food products sold in Brazil. **Foodborne Pathog Dis.** V.8, n.4, p.561-3, 2011.

ROBERSON, J.R.; FOX, L.K.; HANCOCK, D.D.; GAY, J.M.; BESSER, T.E. Ecology of *Staphylococcus aureus* isolated from various sites on dairy farms. **J Dairy Sci.** v.77, p.3354–3364, 1994.

ROBINSON, D.A.; MONK, A.B.; COOPER, J.E.; FEIL, E.J.; ENRIGHT, M.C. Evolutionary genetics of the accessory gene regulator (*agr*) locus in *Staphylococcus aureus*. **J Bacteriol.** V.187, p.8312–8321, 2005.

ROCHE, F.M.; MEEHAN, M.; FOSTER, T.J. The *Staphylococcus aureus* surface protein SasG and its homologues promote bacterial adherence to human desquamated nasal epithelial cells. **Microbiology.** V.149, p.2759–2767, 2003.

RODE, T.M.; LANGSRUD, S.; HOLCK, A.; MØRETRØ, T. Different patterns of biofilm formation in *Staphylococcus aureus* under food-related stress conditions. **Int J Food Microbiol.** V.116, n.3, p.372-83, 2007.

RODRIGUES, L.B.; DOS SANTOS, L.R.; TAGLIARI, V.Z.; RIZZO, N.N.; TRENHAGO, G.; DE OLIVEIRA, A.P.; GOETZ, F.; DO NASCIMENTO, V.P. Quantification of biofilm production on polystyrene by *Listeria*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* isolated from a poultry slaughterhouse. **Braz J Microbiol.** V.41, n.4, p.1082-5, 2010.

ROHDE, H.; KNOBLOCH, J.K.; HORSTKOTTE, M.A.; MACK, D. Correlation of *Staphylococcus aureus* *ica*A<sub>DB</sub>C genotype and biofilm expression phenotype. **J Clin Microbiol.** V.39, n.12, p.4595-6, 2001.

ROHDE, H.; BURANDT, E.C.; SIEMSEN, N.; FROMMELT, L.; BURDELSKI, C.; WURSTER, S.; SCHERPE, S.; DAVIES, A.P.; HARRIS, L.G.; HORSTKOTTE, M.A.; KNOBLOCH, J.K.; RAGUNATH, C.; KAPLAN, J.B.; MACK, D. Polysaccharide intercellular adhesin or protein factors in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* isolated from prosthetic hip and knee joint infections. **Biomaterials.** v. 28, n.9, p.1711-20, 2007.

ROGERS, K.L.; FEY, P.D.; RUPP, M.E. Coagulase-negative staphylococcal infections. **Infect Dis Clin North Am.** v.23, n.1, p.73-98, 2009.

ROSSI F. The challenges of antimicrobial resistance in Brazil. **Clin Infect Dis.** v.52, n.9, p.1138-43, 2011.

RUHE, J.J. & MENON, A. Clinical significance of isolated *Staphylococcus aureus* central venous catheter tip cultures. **Clin Microbiol Infect Dis.** V.12, p.933-6, 2006.

SADER, H.S.; GALES, A.C.; PFALLER, M.A.; MENDES, R.E.; ZOCCOLI, C.; BARTH, A.; JONES, R.N. Pathogen frequency and resistance patterns in Brazilian hospitals: summary of results from three years of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **Braz J Infect Dis.** V.5, n.4, p.200-14, 2001.

SADER, H.S.; JONES, R.N.; ANDRADE-BAIOCCHI, S.; BIEDENBACH, D.J. e SENTRY Participants Group (Latin America). Four-year evaluation of frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility patterns of bacteria from bloodstream infections in Latin American medical centers. **Diag Microbiol Infect Dis.** V.44, p.273-80, 2002.

SADER, H.S.; JONES, R.N.; GALES, A.C.; SILVA, J.B.; PIGNATARI, A.C.; SENTRY Participants Group (Latin America). SENTRY antimicrobial surveillance program report: Latin American and Brazilia n results for 1997 through 2001. **Braz J Infect Dis.** V.8, n.1, p.25-79, 2004.

SADER, H.S.; MOET, G.J.; JONES, R.N. Antimicrobial resistance among Gram-positive bacteria isolated in Latin American hospitals. **J Chemother.** V.21, n.6, p.611-20, 2009.

SADER, H.S.; JONES, R.N.; GALES, A.C.; SILVA, J.B.; PIGNATARI, A.C.; SENTRY Participants Group (Latin America). SENTRY antimicrobial surveillance program report: Latin American and Brazilian results for 1997 through 2001. **Braz J Infect Dis.** V.8, n.1, p.25-79, 2004.

SADER, H.S.; STREIT, J.M.; FRITSCH, T.R. Jones RN. Antimicrobial susceptibility of gram-positive bacteria isolated from European medical centres: results of the Daptomycin Surveillance Programme (2002-2004). **Clin Microbiol Infect.** V.12, n.9, p.844-52, 2006.

SADOYAMA, G.; SANTOS, K.R.; BRILHANTE, A.P.; FILHO, P.P. *Staphylococcus aureus* as source of catheter related bloodstream infection evaluated by PFGE and rep-PCR typing in a Brazilian hospital. **APMIS.** V.116, n.11, p.953-60, 2008.

SAKOULAS, G.; ELIOPOULOS, G.M.; MOELLERING, R.C. JR.; WENNERSTEN, C.; VENKATARAMAN, L.; NOVICK, R.P.; GOLD, H.S. Accessory Gene Regulator (*agr*) Locus in Geographically Diverse *Staphylococcus aureus* Isolates with Reduced Susceptibility to Vancomycin **Antimicrobial Agents And Chemotherapy.** p.1492–1502, 2002.

SAKOULAS, G.; ELIOPOULOS, G.M.; MOELLERING, R.C. JR.; NOVICK, R.P.; VENKATARAMAN, L.; WENNERSTEN, C.; DEGIROLAMI, P.C.; SCHWABER, M.J.; GOLD, H.S. *Staphylococcus aureus* accessory gene regulator (*agr*) group II: is there a relationship to the development of intermediate-level glycopeptide resistance? **J Infect Dis.** V.187, n.6; p.929-38, 2003.

- SAKOULAS, G.; MOISE, P.A.; RYBAK, M.J. Accessory gene regulator dysfunction: an advantage for *Staphylococcus aureus* in health-care settings? **J Infect Dis.** V.199, n.10, p.1558-9, 2009.
- SALOMAO, R.; ROSENTHAL, V.D.; GRIMBERG, G.; NOUER, S.; BLECHER, S.; BUCHNER-FERREIRA, S.; VIANNA, R.; MARETTI-DA-SILVA, M.A. Device-associated infection rates in intensive care units of Brazilian hospitals: findings of the International Nosocomial Infection Control Consortium. **Rev Panam Salud Publica.** V.24, n.3, p.195-202, 2008.
- SANCTIS, J.T.; SWAMI, A.; SAWARYNSKI, K.; GERASYMCHUK, L.; POWELL, K.; ROBINSON-DUNN, B.; CARPENTER, C.F.; SIMS, M.D. Is there a clinical association of vancomycin MIC creep, agr group II locus, and treatment failure in MRSA bacteremia? **Diagn Mol Pathol.** V.20, n.3, p.184-8, 2011.
- SANTOS, K.R.N.; FONSECA, L.S.; TEIXEIRA, L.M.; GONTIJO FILHO P.P. Typing of *Staphylococcus aureus* from surgical site infections: comparison of pulsed-field gelelectrophoresis (PFGE) and PCR technique using repetitive extragenic palindromic (rep) and Tn916-Shine-Dalgarno (TnSD) target sequences. **Int J Med Microbiol.** V.291, n.3, p.231-6, 2001.
- SCHITO, G.C. The importance of the development of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. **Clin Microbiol Infect.** V.12, n.1, p.3-8.
- SCHLIEVERT, P.M.; SHANDS, K.N.; DAN, B.B.; SCHMID, G.P.; NISHIMURA, R.D. Identification and characterization of an exotoxin from *Staphylococcus aureus* associated with toxic-shock syndrome. **J Infect Dis.** V.143, n.4, p.509-16, 1981.
- SEARS, P.M.; MCCARTHY, K.K. Management and treatment of staphylococcal mastitis. **Vet Clin North Am Food Anim Pract.** v.9, n.1, p.171-85, 2003.
- SEEGERS, H.; FOURICHON, C.; BEAUDEAU, F. Production effects related to mastitis and mastitis economics in dairy cattle herds. **Vet Res.** V.34, n.5, p.475-91, 2003.
- SEONG, W.J.; KIM, J.H.; KWON, H.J. Comparison of complete *rpoB* gene sequence typing and multi-locus sequence typing for phylogenetic analysis of *Staphylococcus aureus*. **J Gen Appl Microbiol.** V.59, n.5, p.335-43, 2013.
- SHOPSIN, B.; DRLICA-WAGNER, A.; MATHEMA, B.; ADHIKARI, R.P.; KREISWIRTH, B.N.; NOVICK, R.P. Prevalence of agr dysfunction among colonizing *Staphylococcus aureus* strains. **J Infect Dis.** V.198, n.8, p.1171-4, 2008.
- SIMEONI, D.; RIZZOTTI, L.; COCCONCELLI, P.; GAZZOLA, S.; DELLAGLIO, F.; TORRIANI, S. Antibiotic resistance genes and identification of staphylococci

collected from the production chain of swine meat commodities. **Food Microbiol.** V.25, n.1, p.196-201, 2008.

SHOPSIN, B.; DRLICA-WAGNER, A.; MATHEMA, B.; ADHIKARI, R.P.; KREISWORTH, B.N.; NOVICK, R.P. Prevalence of agr dysfunction among colonizing *Staphylococcus aureus* strains. **J Infect Dis.** V.198, n.1171– 4, 2008.

SOARES, M.J.; TOKUMARU-MIYAZAKI, N.H.; NOLETO, A.L.; FIGUEIREDO, A.M. Enterotoxin production by *Staphylococcus aureus* clones and detection of Brazilian epidemic MRSA clone (III::B:A) among isolates from food handlers. **J Med Microbiol.** V.46, n.3, p.214-21, 1997.

SPANU, V.; SPANU, C.; VIRDIS, S.; COSSU, F.; SCARANO, C.; DE SANTIS, E.P. Virulence factors and genetic variability of *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw sheep's milkcheese. **Int J Food Microbiol.** V.153, n.1-2, p.53-7, 2012.

SPOERING, A. L. & LEWIS, K. Biofilms and planktonic cells of *Pseudomonas aeruginosa* have similar resistance to killing by antimicrobials. **J. Bacteriol.** V.183, p.6746–6751, 2001.

SOFOS, J.N. & GEORNARAS, I. Overview of current meat hygiene and safety risks and summary of recent studies on biofilms, and control of *Escherichia coli* O157:H7 in nonintact, and *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat, meat products. **Meat Sci.** v.86, n.1, p.2-14, 2010.

SOMERVILLE, G.A.; BERES, S.B.; FITZGERALD, J.R.; DELEO, F.R.; COLE, R.L. In vitro serial passage of *Staphylococcus aureus*: changes in physiology, virulence factor production, and agr nucleotide sequence. **J. Bacteriol.** V.184, p.1430–37, 2002.

SUDAGIDAN, M.; AYDIN, A. Virulence properties of methicillin susceptible *Staphylococcus aureus* food isolates encoding Panton Valentine Leukocidin gene. **Int J Food Microbiol.** V.138, n.3, p.287-91, 2010.

SUNG, J.M.L.; LLOYD, D.H.; LINDSAY, J.A. *Staphylococcus aureus* host specificity: comparative genomics of human versus animal isolates by multi-strain microarray. **Microbiology.** V.154, p.1949–1959, 2008.

STEPANOVIĆ, S.; VUKOVIĆ, D.; HOLA, V.; BONAVENTURA, G.; DJUKIĆ, S.; ĆIRKOVIĆ, I.; RUZICKA, F. Quantification of Biofilm in Microtiter Plates: Overview of testing Conditions and Practical Recommendations for Assessment of Biofilm Production by staphylococci. **APMIS**, v. 115, p.891-899, 2007.

STEWART, P.S.; COSTERTON, J.W. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. **Lancet.** v.358(9276), p.135-8, 2001.

TALAN DA, KRISHNADASAN A, GORWITZ RJ, FOSHEIM GE, LIMBAGO B, ALBRECHT V, MORAN GJ. Comparison of *Staphylococcus aureus* from skin and soft-tissue infections in US emergency department patients, 2004 and 2008. **Clin Infect Dis**. V.53, n.2, p.144-9, 2011.

TEMPLETON, A.; SCHLEGEL, M.; FLEISCH, F.; RETTENMUND, G.; SCHÖBI, B.; HENZ, S.; EICH, G. Multilumen central venous catheters increase risk for catheter-related bloodstream infection: prospective surveillance study. **Infection**. V.36, n.4, p.322-7, 2008.

THOMAS, D.; CHOU, S.; DAUWALDER, O.; LINA, G. Diversity in *Staphylococcus aureus* enterotoxins. **Chem Immunol Allergy**. V.93, p.24–41, 2007.

THOMAS, D.; DAUWALDER, O.; BRUN, V.; BADIOU, C.; FERRY, T.; ETIENNE, J.; VANDENESCH, F.; LINA, G. *Staphylococcus aureus* superantigens elicit redundant and extensive human Vbeta patterns. **Infect Immun**. v.77, p.2043–2050, 2009.

TIGEN, E.T.; DOGRU, A.; KOLTKA, E.N.; UNLU, C.; GURA M. Device-associated nosocomial infection rates and distribution of antimicrobial resistance in a medical-surgical intensive care unit in Turkey. **Jpn J Infect Dis**. V.67, n.1, p.5-8, 2014.

TRABER, K.T.; SHOPSIN, B.; LEE, E.; BENSON, S.; CORRIGAN, R. *Agr* functionality in clinical *Staphylococcus aureus* isolates. **Microbiology**., v.154, n. Pt 8, p.2265-74, 2008.

TSOMPANIDOU, E.; DENHAM, E.L.; BECHER, D.; DE JONG, A.; BUIST, G.; VAN OOSTEN, M.; MANSON, W.L.; BACK, J.W.; VAN DIJL, J.M.; DREISBACH, A. Distinct roles of phenol-soluble modulins in spreading of *Staphylococcus aureus* on wet surfaces. **Appl Environ Microbiol**. V.79, n.3, p.886-95, 2013.

TSUJI, B.T.; RYBAK, M.J.; LAU, K.L.; SAKOULAS, G. Evaluation of Accessory Gene Regulator (*agr*) Group and Function in the Proclivity towards Vancomycin Intermediate Resistance in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**. V.51, N.3, p.1089–1091, 2007.

U.S. Food and Drug Administration, 1998. Bacteriological Analytical Manual, eighth ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA.

U.S. Food and Drug Administration, 2000. Report of the FDA Retail Food Program Database of Foodborne Illness Risk Factors. U. S. Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition, Washington, D. C.

VAN BELKUM, A.; VAN LEEUWEN, W.; KAUFMANN, M.E.; COOKSON, B.; FOREY, F.; ETIENNE, J.; GOERING, R.; TENOVER, F.; STEWARD,

C.; O'BRIEN, F.; GRUBB, W.; TASSIOS, P.; LEGAKIS, N.; MORVAN, A.; EL SOLH, N.; DE RYCK R.; STRUELENS, M.; SALMENLINNA, S.; VUOPIO-VARKILA, J.; KOOISTRA, M.; TALENS, A.; WITTE, W.; VERBRUGH, H. Assessment of resolution and intercenter reproducibility of results of genotyping *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis of SmaI macrorestriction fragments: a multicenter study. **J Clin Microbiol.** V.36, n.6, p.1653-9, 1998.

VAN DEN BUSSCHE, R.A.; LYON, J.D.; BOHACH, G.A. Molecular evolution of the staphylococcal and streptococcal pyrogenic toxin gene family. **Mol Phylogenet Evol.** V.2, n.4, p.281-92, 1993.

VANDENESCH, F.; NAIMI, T.; ENRIGHT, M.C.; LINA, G.; NIMMO, G.R.; HEFFERNAN, H.; LIASSINE, N.; BES, M.; GREENLAND, T.; REVERDY, M.E.; ETIENNE, J. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Panton-Valentine leukocidin genes: Worldwide emergence. **Emerg Infect Dis.** V.9, n.978–984, 2003.

VANDERHAEGHEN, W.; HERMANS, K.; HAESEBROUCK, F.; BUTAYE, P. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in food production animals. **Epidemiol Infect.** v.138, n.5, p.606-25, 2010.

VADYVALOO, V.& OTTO, M. Molecular genetics of *Staphylococcus epidermidis* biofilms on indwelling medical devices. **Int J Artif Organs.** V.28, n.11, p.1069-78.

VAN HOUDT, R.; MICHIELS, C.W. Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface. **J Appl Microbiol.** V.109, n.4, p.1117-31, 2010.

VAN LOO, I.H.; DIEDEREN, B.M.; SAVELKOUL, P.H.; WOUDEBERG, J.H.; ROOSEDAAL, R.; VAN BELKUM, A.; LEMMENS-DEN TOOM, N.; VERHULST, C.; VAN KEULEN, P.H.; KLUYTMANS, J.A. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in meat products, the Netherlands. **Emerg Infect Dis.** V.13, n.11, p.1753-5, 2007.

VANNUFFEL, P.; EZZEDINE, H.; VANDERCAM, B.; DELMME, M.; WANTERS, G.; GALA, J.L. Specific detection of methicillin resistant *Staphylococcus* species by multiplex PCR. **J Clin Microbiol,** v.33, p. 2864-2867, 1998.

VAUDAUX, P.; FERRY, T.; UÇKAY, I.; FRANÇOIS, P.; SCHRENZEL, J.; HARBARTH, S.; RENZONI, A. Prevalence of isolates with reduced glycopeptide susceptibility in orthopedic device-related infections due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.** V.31, n.12, p.3367-74, 2012.

VÁZQUEZ-SÁNCHEZ, D.; HABIMANA, O.; HOLCK, A. Impact of food-related environmental factors on the adherence and biofilm formation of natural *Staphylococcus aureus* isolates. **Curr Microbiol.** V.66, n.2, p.110-21, 2013.

VAUDAUX, P.D.; PITTET, A.; HAEBERLI, E.; HUGGLER, U.E.; NYDEGGER, D.P.; LEW, F.A. Host factors selectively increase staphylococcal adherence on inserted catheters: a role for fibronectin and fibrinogen or fibrin. **J. Infect. Dis.** V.160, p.865–875, 1989.

VAUTOR, E.; ABADIE, G.; GUIBERT, J.M.; CHEVALIER, N.; PÉPIN, M. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* in dairy sheep. **Vet Microbiol.** V.106, n.3-4, p.235-9, 2005.

VENTURA, C.L.; MALACHOWA, N.; HAMMER, C.H.; NARDONE, G.A.; ROBINSON, M.A.; KOBAYASHI, S.D.; DELEO, F.R. Identification of a novel *Staphylococcus aureus* two-component leukotoxin using cell surface proteomics. **PLoS One.** V.5, n.7, p.11634, 2010.

VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T.; LUPSKI, J.R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic Acids Res.** V.19, n.24, p.6823-31, 1991.

VIEDMA, E.; SANZ, F.; ORELLANA, M.A.; SAN JUAN, R.; AGUADO, J.M.; OTERO, J.R.; CHAVES, F. Relationship between agr dysfunction and reduced vancomycin susceptibility in methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* causing bacteraemia. **J Antimicrob Chemother.** V.69, p.51–58, 2014.

VINCZE, S.; STAMM, I.; KOPP, P.A.; HERMES, J.; ADLHOCH, C.; SEMMLER, T.; WIELER, L.H.; LÜBKE-BECKER, A.; WALTHER, B. eCollection Alarming Proportions of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Wound Samples from Companion Animals, Germany 2010-2012. **PLoS One.** N.9, v.1, p.e85656, 2014.

VON EIFF, C.; HEILMANN, C.; PETERS, G. New aspects in the molecular basis of polymer-associated infections due to *staphylococci*. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.** V.18, n.12, p.843-6, 1999.

VON EIFF, C.; BECKER, K.; MACHKA, K.. Nasal carriage as a source of *Staphylococcus aureus* bacteremia. **N Engl J Med.** V.344, p.11–16, 2001.

VON EIFF, C.; PETERS, G.; HEILMANN, C. Pathogenesis of infections due to coagulase-negative staphylococci. **Lancet Infect Dis.** V.2, n.11, p.677-85, 2002.

VUONG, C.; SAENZ, H.L.; GÖTZ, F.; OTTO, M. Impact of the agr quorum-sensing system on adherence to polystyrene in *Staphylococcus aureus*. **J Infect Dis.** v.182, n.6, p.1688-93, 2000.

VUONG C.; GERKE C.; SOMERVILLE G.A.; FISCHER E.R.; OTTO M. Quorum-sensing control of biofilm factors in *Staphylococcus epidermidis*. **J Infect Dis.**, v.188, n.5, p.706-18., 2003.

XU, H.; ZOU, Y.; LEE, H.Y.; AHN, J. Effect of NaCl on the biofilm formation by foodborne pathogens. **J Food Sci.** v.75, n.9, p.M580-5, 2010.

ZHANG, L.; GOWARDMAN, J.; MORRISON, M.; KRAUSE, L.; PLAYFORD, E.G.; RICKARD, C.M. Molecular investigation of bacterial communities on intravascular catheters: no longer just *Staphylococcus*. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.**, 2014.

ZIMMERLI, W.; TRAMPUZ, A.; OCHSNER, P. E. Prosthetic-joint infections. **N. Engl. J. Med.** V.351, p.1645–1654, 2004.

ZOTTOLA, E.A. & SASAHARA, K.C. Microbial biofilms in the food processing industry--should they be a concern? **Int J Food Microbiol.** V.23, n.2, p.125-48, 1994.

YARWOOD, J.M. & SCHLIEVERT, P.M. Quorum sensing in *Staphylococcus* infections. **J Clin Invest.** v.112, n.11, p.1620-5, 2003.

YARWOOD, J. M.; BARTELS, D. J.; VOLPER, E. M.; GREENBERG, E. M. Quorum sensing in *Staphylococcus aureus* biofilms. **J. Bacteriol.** V.186, p.1838– 1850, 2004.

YARWOOD, J.M.; PAQUETTE, K.M.; TIKH, I.B.; VOLPER, E.M.; GREENBERG, E.P. Generation of virulence factor variants in *Staphylococcus aureus* biofilms. **J Bacteriol.** V.189, n.22, p.7961-7, 2007.

YE, Y.; JIANG, Q.; WU, Q.; ZHANG, J.; LU, J.; LIN, L. The characterization and comparison of *Staphylococcus aureus* by antibiotic susceptibility testing, enterobacterial repetitive intergenic consensus-polymerase chain reaction, and random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction. **Foodborne Pathog Dis.** V.9, n.2, p.168-71, 2012.

YOON, H.J.; CHOI, J.Y.; LEE, K.; YONG, D.; KIM, J.M.; SONG, Y.G. Accessory gene regulator group polymorphisms in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an association with clinical significance. **Yonsei Med J.** v.48, n.2, p.176-83, 2007.

YUCEL, N.; CITAK, S.; BAYHÜN, S. Antimicrobial resistance profile of *Staphylococcus aureus* isolated from clinical samples and foods of animal origin. **Foodborne Pathog Dis.** V.8, n.3, p.427-31, 2011.

WALTERS, M. C.; ROE, F.; BUGNICOURT, A.; FRANKLIN, M. J.; STEWART, P. S. Contributions of antibiotic penetration, oxygen limitation, and low metabolic activity to tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to



ciprofloxacin and tobramycin. **Antimicrob. Agents Chemother.** V.47, p.317–323, 2003.

WANA, M.T.; LAUDERDALE, T.L.; CHOU, C.C. Characteristics and virulence factors of livestock associated ST9 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel recombinant staphylocoagulase type. **Veterinary Microbiology.** ,2012

WATERS, C.M.; BASSLER, B.L. Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. **Annu Rev Cell Dev Biol.** V.21, p.319-46, 2005.

WATTINGER, L.; STEPHAN, R.; LAYER, F.; JOHLER, S. Comparison of *Staphylococcus aureus* isolates associated with food intoxication with isolates from human nasal carriers and human infections. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.** V.4, p.455-64, 2012.

WEI, H.L. & CHIOU, C.S. Molecular Subtyping of *Staphylococcus aureus* from an Outbreak Associated with a Food Handler. **Epidemiol Infect.** v.128, p.15–20, 2002.

WEESE, J.S.; REID-SMITH, R.; ROUSSEAU, J.; AVERY, B. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) contamination of retail pork. **Can Vet J.** v.51, n.7, p.749-52, 2010.

WENDLANDT, S.; SCHWARZ, S.; SILLEY, P. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a food-borne pathogen? **Annu Rev Food Sci Technol.** v.4, p.117-39, 2013.

WENZEL, R. & HERRMANN, R. Repetitive DNA sequences in *Mycoplasma pneumoniae*. **Nucleic Acids Res.** v.16, n.1, p.8337–8350, 1988.

WEI, H.L. & CHIOU, C.S. Molecular subtyping of *Staphylococcus aureus* from an outbreak associated with a food handler. **Epidemiol Infect.** v128, n.1, p.15-20, 2002.

WERTHEIM, H.F.; VOS, M.C.; OTT, A.; VAN BELKUM, A.; VOSS, A.; KLUYTMANS, J.A.; VAN KEULEN, P.H.; VANDENBROUCKE-GRAULS, C.M.; MEESTER, M.H.; VERBRUGH, H.A. Risk and outcome of nosocomial *Staphylococcus aureus* bacteraemia in nasal carriers versus non-carriers. **Lancet.** V.364, n.9435, p.703-5, 2004.

WRIGHT, J.S. III; JIN, R.; NOVICK, R.P. Transient interference with *staphylococcal* quorum sensing blocks abscess formation. **Acad. Sci. USA.** V.102, p.1691–96, 2005.