

**Universidade de São Paulo
Faculdade de Saúde Pública**

Pesquisa de genes de resistência a antimicrobianos
beta-lactâmicos e de enterotoxina em cepas de
Staphylococcus aureus presentes em
amostras de alimentos

Camila Fonseca Rizek

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Saúde Pública para obtenção
do título de Mestre em Saúde Pública.

Área de concentração: Serviço de Saúde Pública

Orientador: Prof. Dr. Pedro Manuel Leal Germano

**São Paulo
2010**

Pesquisa de genes de resistência a antimicrobianos
beta-lactâmicos e de enterotoxina em cepas de
Staphylococcus aureus presentes em
amostras de alimentos

Camila Fonseca Rizek

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Saúde Pública para obtenção
do título de Mestre em Saúde Pública.

Área de concentração: Serviço de Saúde Pública

Orientador: Prof. Dr. Pedro Manuel Leal Germano

São Paulo
2010

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na sua forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da tese/dissertação.

Da mesma forma que meu pai dedicou seu mestrado a mim, dedico este trabalho a ele. Tenho certeza que ele estaria contente em vê-lo realizado e em ver sua filha crescendo. Dedico também à minha mãe que sempre foi meu apoio, minha força, minha inspiração e companheira de todos os momentos, bons e ruins. Dedico por último a todos que amo, família e amigos, por serem minha motivação e alegria.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiro, a Deus por tudo que recebi. Agradeço meu orientador **Professor Doutor Pedro Manuel Leal Germano** pela oportunidade e crédito. A Cnpq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pelo financiamento da bolsa de mestrado. Agradeço à **Professora Doutora Maria Helena Matté** pela dedicação e instrução em todo o processo. Às técnicas do laboratório **Miriam Lopes** e **Milena Dropa** pela instrução e enorme ajuda dada. Da mesma forma, agradeço a todas as pessoas que passaram pelo laboratório de **Prática em Saúde Pública** nestes mais de 2 anos. Em particular, as amigas **Lícia Natal Fernandes**, **Kévilin Anahí Gonzales Sábio**, **Patricia Pereira de Souza**, **Cíntia Carolina da Silva Mayer** e **Helena Mayumi Muranaka** que não só foram prestativas no processo como grandes amigas e companheiras. Agradeço de forma especial a companheira de mestrado e caminhada **Elisabeth Mendes Martins de Moura** pela extrema ajuda, pelo apoio, pela amizade, pela solidariedade e tudo mais que ela fez por mim desde 2007, tudo teria sido mais difícil sem ela.

Agradeço aos professores de todas as disciplinas que realizei pela oportunidade de me aprofundar em diversos temas. Agradeço as colegas de aula **Ana Laura Boechat Borges** e **Carolina Antunes do Prado Tavares Silva** por me ajudarem a superar um momento difícil e por ser uma força para eu continuar meu mestrado.

Agradeço minha **família** pela torcida. Minha outra família de biólogos: **Julia Ramos Estevão**, **Otavio Lino**, **Pedro Cattony**, **Sérgio Campos**, **Luciana Turolla**, **Mariana Bryan**, **Ana Paula Buzo Marcondelli** (as patológicas!) pelo apoio, troca de experiências e ajuda no processo e em toda minha vida desde a faculdade. Dentro destes que fazem parte de minha formação como pessoa e bióloga, agradeço também **Marina Loeb**, **Lia Sabinson**, **Giovana Cruz Corsi**, **Patrícia Martinho**, **Marcelo Balestrin**, **Helena Janke**, **Luciana Jatobá**, **Natália Cerântola**, **Valéria Ghislotti Iared**, **Graciela Soares**, **Carolina**

Bittencourt, Juliana Fernandes Okuda e muitos que passaram pela minha vida e não constam aqui. Agradeço ao **Jeferson Vasconcellos** pelo carinho.

A meu tio, **Sérgio Rizek**, por ter sido tão atencioso e solícito como “pai substituto”. Meus tios, **Marcelo David** e **Silvia da Fonseca David**, pelo suporte, carinho e força essenciais para eu ter me tornado bióloga e persistido com na minha formação. E, em especial, à minha mãe, **Henriete Aparecida da Fonseca**, e irmão, **Ilya da Fonseca Amarante**, que são cúmplices da minha vida.

RIZEK, CF. Pesquisa do gene *mecA* e codificador de enterotoxina SEA em *Staphylococcus aureus* presentes em amostras de alimentos prontos para consumo. [dissertação de mestrado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP; 2010.

RESUMO

Introdução: *Staphylococcus aureus* são microrganismos causadores de diversos tipos de doenças. Existem dois grandes agravantes a sua presença: a produção de toxinas e a resistência a antimicrobianos. *S. aureus* produzem enterotoxinas termolábeis que, quando presentes nos alimentos, podem levar a uma toxinfecção a quem o consumir. Esta espécie também é conhecida por facilmente responder adaptativamente ao uso de drogas tornando-se cada vez mais difícil controlá-la. Um dos maiores responsáveis por esta preocupação são os MRSA (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*), resistentes a beta-lactâmicos através da produção de uma proteína diferenciada de parede codificada pelo gene *mecA*. A presença deste patógeno resistente fora do ambiente hospitalar é registrada há alguns anos e pouco a pouco vem se descobrindo que a via alimentar pode ser um meio deste gene se disseminar. **Objetivos:** procurar pelo gene *mecA* e o codificador da enterotoxina em *Staphylococcus aureus* de amostras alimentares para discutir a presença do gene de resistência em uma nova via de transmissão e a validade de apenas se fiscalizar a presença apenas de *Staphylococcus coagulase* positivo em produtos alimentares como forma de manter o alimento seguro contra toxinfecções. **Métodos:** Cinquenta e sete amostras de *S. aureus* provenientes de amostras de quatro tipos de fontes alimentares foram testadas por PCR com primer específico para o gene *mecA* e para o gene codificador da enterotoxina. **Resultados:** Destas, cinco (8,8% do total) amostras apresentaram o gene de resistência e onze (19,2% do total) continham o gene codificador da enterotoxina termolábil. **Conclusão:** A presença do gene de enterotoxina em produtos prontos para consumo e peixe cru de feira é uma realidade, assim como o debate sobre qual a melhor forma de se legislar sobre o assunto que deve ser mantido e melhor avaliado. Já no caso do gene de resistência, evidenciou-se que a via alimentar é sim local de circulação do gene de resistência. Também é a primeira vez que se notifica o gene *mecA* em alimentos prontos para consumo no Brasil e América Latina.

Descritores: *Staphylococcus aureus*, Farmacorresistência Bacteriana, Enterotoxinas, Alimentos, Epidemiologia.

ABSTRACT

Introduction: *Staphylococcus aureus* are a bacterium that causes various types of diseases. There are two major aggravating to its presence: the toxins production and antimicrobial resistance. *S. aureus* produce heat-labile enterotoxins that, when present in food, can lead to poisoning of those who consume. This specie is also known to easily respond adaptively to drug use becoming increasingly difficult to control it. One of the main reasons for this concern are MRSA (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) which are resistant to beta-lactams drugs through a differentiated wall protein production encoded by the *mecA* gene. The presence of this resistant pathogen outside hospitals has been recorded a few years ago and gradually comes to discover that the food chain can be a way for the gene spread.

Objectives: Search for the *mecA* gene and the enterotoxin's encoded gene in *Staphylococcus aureus* from food samples to discuss the presence of the resistance gene in a new transmission route and the validity of only review the presence of *Staphylococcus coagulase positive* in food product as a way to keep insurance against food poisoning.

Methods: Fifty-seven samples of *S. aureus* from five different sources of food samples were tested by PCR with specific primer for the *mecA* gene and the enterotoxin's gene.

Results: Of these, five (8,8% of total) samples showed the resistance gene and eleven (19,2% of total) contained the gene encoding the heat-labile enterotoxin.

Conclusion: The presence of enterotoxin encoded gene in food products ready for consumption and raw fish is a fact and a debate about how best to legislate should be maintained and better evaluated. In the case of the resistance gene, the food chain is really a way where this gene can spread. It is also the first time the *mecA* gene from food ready for consumption is reported in Brazil and Latin America.

Descriptors: *Staphylococcus aureus*, Bacterial Drug Resistance, Enterotoxins, Food, Epidemiology.

ÍNDICE

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS	15
1.1.1 Resistência a Antibióticos Beta-lactâmicos	16
1.1.2 A Resistência ao Redor do Mundo e MRSA em Alimentos	21
1.2 ENTEROTOXINA	26
1.2.1 Aspectos Gerais das Enterotoxinas Estafilocócicas	26
1.2.2 A Concepção de Alimento Seguro	29
2 OBJETIVOS	31
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
3 MATERIAL E MÉTODO	32
3.1 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DO <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>	32
3.2 ANTIBIOGRAMA	32
3.3 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO	33
3.4 AMPLIFICAÇÃO DO DNA	34
3.5 VISUALIZAÇÃO E ANÁLISE DOS PRODUTOS DA PCR	37
3.6 PURIFICAÇÃO DO “AMPLICON” E SEQUENCIAMENTO DO FRAGMENTO PARA AS CEPAS POSITIVAS PARA <i>mecA</i>	35

4 RESULTADOS	39
4.1 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DO <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>	39
4.2 PESQUISA DOS GENES <i>mecA</i> E <i>sea</i>	42
4.2.1 Gene <i>sea</i>	42
4.2.2 Gene <i>mecA</i>	44
4.3 SEQUENCIAMENTO DOS GENES <i>mecA</i>	45
4.4 RESISTÊNCIA FENOTÍPICA	45
5 DISCUSSÃO	48
6 CONCLUSÃO	58
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
ANEXOS	65
Anexo 1	65
GLOSSÁRIO	65
CURRÍCULO LATTES ALUNA	69
CURRÍCULO LATTES ORIENTADOR	70

ÍNDICE DE FIGURAS, QUADROS E TABELAS

FIGURAS

- Figura 1.** Placa de teste em meio ágar Manitol 40
- Figura 2.** Gel de Agarose 1,2% com resultado da amplificação da região 16S do rDNA para identificação genotípica da espécie *S. aureus*. As bandas correspondem ao “amplicon” da região selecionada do rDNA 16S com 800pb. 40
- Figura 3.** Gel de Agarose 1,2% com resultado da amplificação do gene codificador da enterotoxina SEA. As bandas correspondem ao “amplicon” de 480pb do gene específico. 43
- Figura 4.** Gel de Agarose 2% com resultado da amplificação do gene *mecA*. As bandas correspondem ao “amplicon” de 280pb do gene específico. 44
- Figura 5.** Sequência obtida dos “amplicons” resultantes da reação de PCR para o gene *mecA* e do controle positivo ATCC33591 usado na comparação. 46
- Figura 6.** Imagem de uma placa de petri com cepa resistente à Oxacilina (1µg) no teste de disco-difusão em ágar Mueller Hinton 47

QUADROS

- Quadro 1.** Iniciadores para identificação de *Staphylococcus aureus*, pesquisa do gene de resistência *mecA* e do gene codificador da enterotoxina (SEA) e suas referências. **36**
- Quadro 2.** Ciclo inicial, temperatura e tempo de cada ciclo, extensão final e tamanho do fragmento para as reações de PCR de cada iniciador **36**
- Quadro 3.** Resultados dos testes fenotípicos de identificação e resistência e genotípicos da procura dos genes *mecA* e *sea* nas 57 amostras testadas. **41**

TABELAS

- Tabela 1 .** Quantidade de cepas positivas para gene de enterotoxina (*sea*), para o gene *mecA* e para resistência fenotípica à Oxacilina (OXAR) por tipo de amostra de alimento. **43**

1 INTRODUÇÃO

Staphylococcus são cocos gram-positivos que habitam as membranas mucosas, o intestino, o trato respiratório superior e a pele dos seres humanos. São responsáveis por múltiplas infecções supurativas. O *Staphylococcus aureus* é a espécie mais frequentemente responsável por gastroenterites (toxinfecções), isto ocorre dada à participação dos manipuladores no processo de produção de alimentos (GERMANO PML e GERMANO MIS, 2007). Estes indivíduos são aqueles que podem entrar em contato com os produtos alimentícios desde sua fonte até o consumidor (GERMANO, 2003), e, em geral, albergam o microrganismo na pele, trato respiratório, dentre outros. Na França, por exemplo, este microrganismo representa a segunda maior causa de doenças originadas por esta via de infecção (KÉROUANTON et al., 2006) e é considerada a terceira maior causa de doença gastrentérica no mundo segundo PELES et al. (2007).

S. aureus é a espécie mais relevante para saúde pública, e, por consequência, a mais estudada e conhecida do gênero *Staphylococcus* (WILKISON et al., 1997). Além disso, produz a maior variedade de exoproteínas que, muitas vezes, causam danos ao hospedeiro por dois motivos. Primeiro, por meio de proteínas enzimáticas como proteinases, DNAses e coagulases, por exemplo, que são uma forma de obter alimento para a bactéria, mas para o hospedeiro é uma agressão. Segundo, por proteínas não-enzimáticas que teriam provavelmente função apenas de debilitar ao máximo o hospedeiro e seu sistema imune para que o microrganismo pudesse crescer e estabelecer-se. Tais proteínas são as da síndrome do choque tóxico (TSST-1), enterotoxina estafilocócica (SEs), superantígenos tóxicos pirogênicos (PTAGs), toxinas esfoliativas (ETs) e a leucocidina (BOHACH et al., 1997).

Os microrganismos do gênero *Staphylococcus* são também resistentes à desidratação e podem permanecer viáveis por longo tempo no ambiente. Eles também podem colonizar o trato respiratório, gastrointestinal e pele humana de forma assintomática, sendo que, em algumas pessoas pode ser uma colonização persistente e em outras uma colonização transitória. Em indivíduos saudáveis essa colonização, que atinge 30% da população em média, não causa nenhum risco a não ser que alguma barreira seja quebrada. Por exemplo, se a pele sofrer ferimentos o risco de infecção é consideravelmente alto (KLUYTMANS, 2010). As infecções não enterotoxigênicas com *S. aureus* mais frequentes são as de pele e tecidos moles. Este tipo de infecção aumentou de 24 casos no ano de 2000 para 164,2 por 100000 pessoas em 2005 nos Estados Unidos (YAMAMOTO et al., 2010). Em animais, são igualmente importantes: são responsáveis por mais de 80% das mastites bovinas e, conseqüentemente, tornam o leite e produtos lácteos em geral veículos comuns do microrganismo (KARAHAN et al., 2009).

Quanto à gastroenterite, já em 1994 se estimava que 1 a 2 milhões de pessoas apresentassem, por ano, uma toxinfecção por *S. aureus* nos Estados Unidos. No Brasil, de 1984 a 1997, o Ministério da Saúde registrou 593.212 casos de toxinfecção de origem alimentar, embora não especifique o microrganismo o que traz dificuldades para a análise dos casos no país. Esses dados, porém, são apenas demonstrativos da dimensão do problema que este microrganismo pode causar já que a maioria dos surtos alimentares nunca foi e nem é registrados originando uma quantidade subestimada de casos (FAGUNDES e OLIVEIRA, 2004).

S. aureus são encontrados em diversas amostras de alimentos, como em locais de produção de leite (PELES et al., 2007), já que está associado de forma muito intensa à mastite bovina, como já exemplificado a cima. Mas, mais do que isso, todo alimento manipulado está sujeito à contaminação. Na Europa, no período de 1993 a 1998 este

patógeno causou 5,1% dos surtos registrados. Porém a incidência desta bactéria é subestimada, já que a maioria dos surtos de gastroenterite não é relatada. Um estudo detectou 12% de cepas positivas para *S. aureus* de 1634 amostras coletadas de 2003 a 2005 em alimentos lácteos e de origem animal na Itália (NORMANO et al., 2007b).

Porém os indivíduos do gênero *Staphylococcus spp.*, em especial a espécie *S. aureus*, possuem dois grandes agravantes além de sua presença em si: a produção de toxinas termolábeis que permanecem presentes mesmo com a morte do microrganismo e a vasta resistência a antibióticos. No caso das enterotoxinas, mesmo sem a presença do microrganismo, apenas a presença destas em quantidade infectante no alimento, pode causar um surto gastrentérico. Já a resistência a antibióticos pode usar esses microrganismos presentes em alimentos para se disseminar, além de ser um fator preocupante para saúde pública.

1.1 RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS

Nos últimos anos, tem-se observado a emergência de *S. aureus* resistentes a antibióticos, dado seu genoma extremamente adaptável. Desde 1917, mesmo antes da aplicação clínica de tais drogas, já se relatava que microrganismos exibiam a capacidade de se defender mostrando a resistência à terapia química como um processo natural das bactérias. Inicialmente esse fenômeno não causou grande alarde na saúde pública dada à quantidade de componentes disponíveis, porém após o surgimento da resistência a penicilinas sintéticas e a conhecida capacidade de transmissão dessas resistências via plasmídeos, bacteriófagos e elementos móveis o problema se tornou preocupante (GARCÍA-CASTELLANOS et al., 2004; CHA et al., 2007). Para o gênero *Staphylococcus*, a

resistência mais comum e relevante para saúde pública é a antibióticos beta-lactâmicos, seja pela produção da enzima beta-lactamase ou pela produção de uma proteína diferenciada de parede, através de uma região gênica denominada *mec*, que atribui resistência à meticilina/oxacilina (e outros beta-lactâmicos), esses organismos são denominados MRSA (*methicillin-resistant Staphylococcus aureus*) (RANG et al., 2001; LI et al., 2007).

1.1.1 Resistência a Antibióticos Beta-lactâmicos

Os antibióticos beta-lactâmicos são preferíveis e muito usados porque atacam a parede celular da bactéria que é um dos componentes mais acessíveis ao antibiótico e essenciais a vida bacteriana (MCCALLUM et al., 2010). Além disso, não causam efeito cruzado em células de animais por estas não possuem parede celular. Essas drogas possuem uma estrutura principal similar: um anel tiazolidínico, fixado ao anel beta-lactâmico, de onde vem o nome da classe, que, por sua vez, transporta um grupo amino que pode ou não estar ligado a um radical. Essas drogas interferem na ligação cruzada de transpeptidação da parede celular, pois tem uma estrutura correspondente ao substrato das proteínas que catalisam a transpeptidação (PBPs), ligando-se a elas. Se o anel lactâmico é quebrado pela beta-lactamase, o resultado é um ácido penicilóico, sem ação antibacteriana (CHAMBERS, 2003) tornando-o, então, um antibiótico ineficiente quando os microrganismos possuem a capacidade de produzir tal enzima.

Bactérias exibem resistência a esses fármacos por dois mecanismos: a produção da enzima beta-lactamase que quebra o anel beta-lactâmico da substância ou por uma proteína diferenciada (PBP 2a) que possui baixa afinidade com a droga impedindo sua ação (RANG et al., 2001; MCCALLUM et al., 2010). *S. aureus* produtores de beta-lactamase já se

encontram amplamente disseminados há alguns anos. Este problema teria sido resolvido com o surgimento de penicilinas semi-sintéticas, como a meticilina ou oxacilina.

A meticilina (ou oxacilina, seu correspondente no Brasil) é uma penicilina semi-sintética que, em sua maioria, não é hidrolisada pela enzima e começou a ser usada no tratamento de pacientes clínicos em 1960 (CHONGTRAKOOL et al., 2006). Contudo, os organismos passaram a resistir à ação destas drogas com o segundo mecanismo descrito anteriormente, ou seja, a produção da proteína PBP 2a (PARKER e LAPAGE, 1957; RANG et al., 2001; PELES et al., 2007). Existem mais tipos de proteínas PBP que participam dessa função na formação de parede celular, mas a mais significativa no processo de resistência, e encontrada em mais de 90% dos MRSA, é a PBP 2 e sua substituta nos resistentes PBP 2a (HIRAMATSU, 1995).

A proteína modificada não deixa o sítio de ação dos antibióticos beta-lactâmicos acessível, e sim em um sítio fechado. As penicilinas e afins acetilam o sítio ativo da proteína PBP que em sua forma produzida pelo gene *mecA* não está disponível para interação com o fármaco, mas continua com sua capacidade de interagir na formação da parede celular da bactéria (FUDA et al., 2004). Na presença de outras PBPs suscetíveis à beta-lactâmicos, aparentemente não se encontra a PBP 2a agindo na transpeptidação da parede bacteriana, porém, quando as outras proteínas de parede são inativadas por antibióticos, a PBP 2a é solicitada. Contudo, a ligação cruzada na formação de parede celular quando feita pela proteína diferenciada diminui em até 45%, sugerindo que a proteína resistente à meticilina é de ação mais restrita (BÄCHI-BERGER, 1997), sendo usada pelo microrganismo apenas em caso de necessidade.

Esta proteína é codificada pelo gene cromossômico *mecA*, encontrado na região *mec* do DNA e é controlado por 2 outros genes, *mecI* e *mecR1*, que codificam um repressor e um

sinalizador de tradução do gene *mecA* respectivamente. Um MRSA que possua os genes *mecI* e *mecR1* intactos é aparentemente suscetível a meticilina, pois é fortemente reprimido graças à produção da proteína repressora codificada por *mecI* e é chamado de pré-MRSA. Portanto para que o microrganismo se torne efetivamente resistente uma queda da repressão deve ocorrer. Mutações e deleções no gene *mecI* podem levar a essa redução e foram apresentadas em muitos microrganismos resistentes isolados de humanos. Também foi demonstrada a ocorrência de mutações na região do promotor ou operador da região (LEE, 2006). De fato, existem diversos relatos de que tratamentos com diversos antibióticos exercem uma pressão seletiva sobre MRSA já existentes em baixa taxa causando um aumento deste tipo de patógeno resistente. Mais importante ainda, essa pressão seletiva comprovadamente pode converter os pré-MRSA em MRSA ativos (LIPSITCH et al., 2002; HANSSEN e SOLLID, 2005).

O gene *mecR1* expressa uma proteína sensora e sinalizadora de tradução. Seu domínio de membrana tem seu C-terminal acetilado na presença do antibiótico o que causa mudanças conformacionais na molécula. Essa mudança envia o sinal de tradução através de seu domínio citoplasmático que cliva MecI na porção do citoplasma. Uma vez sem MecI para reprimir a codificação do gene *mecA*, a proteína PBP2a é produzida (CHA et al., 2007; HOU et al., 2007). Já a proteína repressora MecI é um dímero que interage com sequências palindrômicas (ou seja, sequências nucleotídicas iguais tanto na direção 5' para 3' como na 3' para 5') da região promotora do complexo *mec* inibindo a transcrição de *mecA* e do próprio *mecI/mecR1* (GARCÍA-CASTELLANOS et al., 2004).

Análises de seqüências nucleotídicas mostram que o gene *mecA* é constituído por 2 regiões homólogas a outros dois genes: *blaZ* (responsável pela produção de beta-lactamase) de *S. aureus* na região 5' e ao gene produtor de PBPs de *Escherichia coli* em sua extensão. Tais dados levaram autores à proposta de que o gene produtor de PBP 2a em MRSA teria

emergido de uma combinação desses dois genes em um microrganismo desconhecido (HIRAMATSU, 1995).

Os complexos *mec* e *bla* se mostraram muito semelhantes molecular e funcionalmente. Tanto *mecR1* quanto *blaR1* são codificadores de proteínas sensores de membrana e indutoras de tradução, MecR1 e BlaR1 respectivamente. Os genes codificadores da proteína repressora também existem nos dois complexos de forma semelhante e se constituem por *mecI* e *blaI*. Semelhantes a tal ponto que a proteína MecI pode reprimir também o complexo *bla* e BlaR1 e assumir a função de MecR1 caso este não esteja funcional. Ambos dispõem os genes da mesma forma dentro do complexo, com os repressores *mecR1/mecI* e *blaR1/blaI* a frente dos promotores dos genes operacionais *mecA* e *blaZ*, respectivamente, e são transcritos em sentido contrário a esses. Tal relação sugere uma ligação evolutiva entre ambas as vias (GARCÍA-CASTELLANOS et al., 2003; GARCÍA-CASTELLANOS et al., 2004).

O conjunto de genes *mec* fica em um complexo móvel do cromossomo conhecido por SCCmec (*staphylococcal cassette chromosome mec*) que contém também um complexo gênico *ccr* e uma região de seqüência repetitiva de inserção do elemento (ORF – *open reading frames*). Estes complexos móveis são divididos em subtipos por uma análise de seu elemento *mec*, *ccr* e regiões intermediárias. Quando as infecções de MRSA começaram a aumentar fora de hospitais, em *Staphylococcus* de comunidade, houve uma divisão pelo seu tipo de SCCmec (CHONGTRAKOOL et al., 2006). Descobriu-se que os tipos I, II e III eram encontrados apenas em hospitais e os tipos IV e V apenas em infecções de comunidade. Existem algumas diferenças entre estes tipos além da divisão por elementos genéticos, os MRSA de comunidade costumam apresentar um elemento SCCmec menor. Isto acontece dado o ambiente em que vivem e sua necessidade em não despender muita energia mantendo um alto nível de resistência, algo que é necessário à sobrevivência de um

microrganismo no ambiente hospitalar. Sendo assim, os MRSA de comunidade tendem a ter um espectro de resistência bem menor que os hospitalares os quais apresentam vantagens em manter um elemento grande e eficiente contra altos níveis de antibióticos (OKUMA et al., 2002).

Estudos mostram que o tipo comunitário (C-MRSA) e o hospitalar (H-MRSA) de MRSA tiveram origens diferentes. Foi comprovado por MLST (“*Multi Locus Sequence Typing*”) e eletroforese de campo pulsado que tais organismos não possuíam o mesmo perfil genético. Além disso, descobriu-se que o C-MRSA compartilhava um perfil com um *S. aureus* não resistentes à meticilina/oxacilina, chamados de NORSA – *non-multiresistant oxacillin-resistant S. aureus* – apresentando uma única diferença: a presença do complexo *mec*. Assim, acredita-se que a introdução deste elemento em um NORSA tenha levado à origem do C-MRSA, diferentemente do que aconteceria em um H-MRSA (OKUMA et al., 2002). No gênero *Staphylococcus*, apenas a transmissão gênica horizontal tem sido observada e seu mecanismo ainda é desconhecido, porém sabe-se que a transferência acontece tanto entre *S. aureus*, como interespécies já que o SCC é um elemento móvel eficiente de transferência de elementos de resistência entre organismos. Outro grande risco é que o SCC_{mec} pode ser transmitido entre organismos mais diversos. Em 2006, foi relatado no Brasil o primeiro caso de MRSA catalase negativa (DEL'ALAMO et al., 2007). De qualquer modo, a definição entre hospitalar e comunitário não é muito precisa, pois atualmente vêm-se encontrando tipos comunitários em surtos de hospitais. Este é o caso de um MRSA SCC_{mec} IVc em uma infecção de origem hospitalar na França onde o mesmo subtipo é encontrado em casos comunitários na Suécia (HANSSEN e SOLLID, 2005). Assim, cada vez mais a classificação entre comunitário e hospitalar se torna confusa e os MRSA se difundem por diversos meios sem restrições.

1.1.2 A Resistência ao Redor do Mundo e MRSA em Alimentos

Os primeiros *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina foram descritos na Inglaterra em 1961 e, são encontrados por todo o mundo desde então (HIRAMATSU, 1995). Os problemas causados por MRSA em ambientes hospitalares já são conhecidos e relatados há mais de 30 anos nos Estados Unidos, contudo, sua presença fora do ambiente hospitalar vem sendo observada nos últimos anos, com envolvimento em surtos alimentares e isolamento de diversos tipos alimentos. Isto pode ser uma forma de disseminação desta categoria de microrganismo para a população que não possui contato com hospitais ou estabelecimentos de saúde (JONES et al., 2002; KLEVENS et al., 2007). Desde 1993, a incidência de MRSA em casos comunitários vem aumentando de número (SCHNEIDER-LINDNER et al., 2007). Este microrganismo multiresistente está geralmente envolvido em casos de infecção de pele, mas pode, em muitos casos, provocar doenças invasivas severas e, diversas vezes, fatais. Além disso, a incidência deste tipo invasivo de MRSA aumentou mais que o dobro em muitos estados dos EUA entre 2002 e 2005 (KLEVENS et al., 2007).

No Brasil, MRSA de origem extra-hospitalar começaram a ser reportados como causa de infecções sérias (endocardites e infecções generalizadas severas, por exemplo) a partir de 2008. Contudo, não existem no país dados com a quantidade de casos reais de MRSA de origem extra-hospitalar (FORTES et al., 2008; ROZENBAUM et al., 2009). Por esta razão, ROZENBAUM et al. (2009) alertam que os casos de MRSA de diversas origens vêm aumentando e que isto traz um desafio em termos de diagnóstico. O primeiro caso infecção causada por MRSA extra-hospitalar na América Latina foi relatado no Brasil, em 2004 (RIBEIRO et al., 2005). Já no caso de MRSA de origem hospitalar, uma linhagem internacional que atualmente causa de 70 a 80% dos casos de MRSA em hospitais, foi

identificada pela primeira vez no Brasil, em 1992 (SOUSA-JUNIOR et al., 2009), mas pouco se tem de informação entre esta data e o presente sobre a existência deste patógeno fora do hospital. Apenas 66% dos *S. aureus* colhidos no Brasil em 2001 eram sensíveis à oxacilina (DEL'ALAMO et al., 2007). Já na procura de MRSA em outros meios, como alimentos prontos para consumo, nada é feito no Brasil, somente um trabalho de 2000 relata a presença de MRSA em leite materno (NOVAK et al., 2000).

É fato que, desde 1957, o grupo de microrganismos que desenvolveu resistência através da produção de beta-lactamase era encontrado apenas em hospitais e estabelecimentos de saúde, porém, atualmente, *Staphylococcus* produtores dessa enzima são amplamente encontrados em quase todos ambientes (PARKER e LAPAGE, 1957; RANG et al., 2001; PELES et al., 2007). A disseminação de MRSA ou *Staphylococcus* resistentes a quaisquer classes de antibióticos e sua saída dos ambientes hospitalares é preocupante principalmente para a população não-hígida, além de representar um novo meio de disseminação de portadores deste gene.

A introdução de um patógeno depende de seus reservatórios e do modo em que esse pode se disseminar. Como o *S. aureus mecA* positivo pode ser facilmente transportado pelo homem (na pele e trato respiratório superior, principalmente), se instala uma dúvida sobre qual reservatório seria de maior necessidade de atenção (CIMOLAI, 2008). Em hospitais grande atenção tem sido dada a esses microrganismos já que eles são a maior causa de infecção hospitalar, mas suas vias de transmissão se tornam muito mais amplas e difíceis de monitorar desde sua saída deste tipo de ambiente. Realmente, qualquer meio capaz de disseminar o *S. aureus* em si é também uma possível rota de propagação do gene de resistência.

Estima-se que a contaminação com *S. aureus* através de alimentos possa provocar 185 mil toxinfecções por ano nos EUA, mas a maioria não é sequer registrada. Muitos *S. aureus* obtidos de amostras de surtos alimentares não são testados em sua suscetibilidade a antibióticos. Isto ocorre porque a gastroenterite causada por este microrganismo é mediada por toxinas e, geralmente, auto-limitada. Sendo assim, antibióticos não são utilizados como terapia em geral e cepas resistentes à meticilina (ou outros antibióticos) podem passar incógnitas (JONES et al., 2002). Um estudo de 2008 no Brasil mostrou, ainda, que cepas de MRSA de no mínimo sete anos anteriores ao trabalho pertenciam a um mesmo clone do tipo comunitário em circulação e que, este único tipo clonal pode estar em circulação há alguns anos no país tendo passado despercebido até então (REINERT et al., 2008).

O homem é o principal reservatório deste microrganismo, ainda que cepas de *S. aureus* de origem humana tenham sido encontradas em animais (GERMANO PML e GERMANO MIS, 2007). Porém, a descoberta de que MRSA presentes em animais e humanos eram de mesma tipagem genotípica, indica serem provindas de mesmos parentais e nos leva a concluir que os animais provavelmente adquirem esse microrganismo através da manipulação humana. Uma vez que a transmissão interespecie ocorreu, esses microrganismos podem se disseminar entre diferentes populações de animais. Mais ainda, pode-se concluir que a infecção de humanos através da alimentação com produtos animais é possível (LEE, 2003). KITAI et al. (2004) também contribuíram para essa conclusão quando obtiveram MRSA de biótipo humano em carne crua de frango para comercialização, provavelmente provenientes da manipulação do produto.

Nos últimos anos, foi registrado o isolamento de MRSA em produtos alimentícios de diferentes origens e em locais de processamento de alimentos (KITAI et al., 2004). Em 2004, KITAI e colaboradores apresentaram evidências da existência de MRSA em carne comercial de frango crua no Japão e, em 2006, LEE descreveu MRSA isolados de amostras

de leite de vacas leiteiras. Outros estudos, ainda, sugerem que carne crua contaminada com MRSA pode constituir um perigo à saúde dos consumidores (JONES et al., 2002).

O primeiro relato de infecção de MRSA originada por alimentos ocorreu em um hospital na Holanda em 1995. A cepa da bactéria envolvida no surto foi isolada da orofaringe de um funcionário encarregado da alimentação do hospital e do alimento servido. Uma paciente da ala de hematologia que estava imunodeprimida contraiu o patógeno o qual invadiu a corrente sanguínea levando a uma infecção fatal. O surto se disseminou por outras alas do hospital, com elevada mortalidade (KLUYTMANS et al., 1995).

Um dos primeiros surtos de origem alimentar manifestado por gastroenterite aguda, provocada por MRSA fora do ambiente hospitalar, ocorreu devido à manipulação de produtos alimentícios por um portador desta categoria de microrganismo. O patógeno foi adquirido possivelmente em uma visita a um familiar que morreu de infecção estafilocócica em uma casa de saúde (como declarado pelo manipulador) (JONES et al., 2002). Estes dois casos revelam o importante papel dos manipuladores no processo de disseminação deste gênero de microrganismo e as dimensões que a transmissão por via alimentar pode adquirir.

NORMANO et al. (2007b) realizaram um estudo com alimentos de origem animal na Itália onde a incidência de infecções por MRSA é uma das mais altas da Europa. Encontraram o gene de resistência *mecA* em 6 amostras de 160 cepas de *Staphylococcus aureus* analisadas. Mesmo sendo um número baixo de microrganismos resistentes encontrados (3,7%), o trabalho aponta para a possibilidade da contaminação extra-hospitalar, o que constitui um grande risco, principalmente para as pessoas imunocomprometidas as quais não são capazes de criar barreiras à colonização e penetração gástrica do MRSA e, sendo assim, a ingestão de alimentos contaminados com *Staphylococcus* multiresistentes pode levar a infecções graves ou fatais.

O crescente aumento do uso de antibióticos sem grandes supervisões é comprovadamente uma força seletiva para o surgimento de resistência a essas drogas como forma de adaptação dos microrganismos. Tal fato levou ao desenvolvimento de outros meios de tratamento e outras drogas que superassem essas barreiras. Diversas medidas já são tomadas em hospitais para tal, como a redução do tempo de uso de certos antibióticos em infecções, a troca rotativa de diferentes drogas para uma mesma condição do paciente e o aumento de medidas profiláticas, porém, fora dos hospitais pouco se faz para controlar a disseminação destes microrganismos resistentes (LIPSITCH e SAMORE, 2002).

A prevenção destes surtos e a diminuição da incidência endêmica de MRSA dependem do entendimento dos mecanismos pelos quais esses microrganismos resistentes são transmitidos. Já é aceito de forma ampla que as mãos de pacientes e profissionais da saúde são um dos principais mecanismos de transmissão do MRSA, contudo, não existe nada muito afirmativo sobre se esse é o único meio de transmissão ou o de maior relevância. Principalmente quando abordamos os pré-MRSA ou MSSA (*methicillin-susceptible Staphylococcus aureus*, ou seja, suscetíveis à meticilina). Com isto se ressalta a questão se estes microrganismos se comportam de forma diferente na sua epidemiologia apenas por conterem elementos de resistência (CIMOLAI, 2008).

CIMOLAI (2008) vai além e afirma que, apesar de pacientes e trabalhadores de hospitais serem uma fonte importante, o fator ambiental deve contribuir em diversas formas e contextos e que, portanto, o controle efetivo deste patógeno deve incluir sua investigação ambiental. Contudo o autor especula amplamente sobre a transmissão por portadores para o ambiente geral, como casas, camas e similares, sem mencionar a via alimentar que faz parte do contexto ambiental. Este veículo é importante principalmente por abranger

manipuladores que podem introduzir estas bactérias nesta via que, assim, tomariam proporções muito maiores de disseminação que de pessoa a pessoa.

Por enquanto pouco se conhece sobre a epidemiologia deste importante patógeno, sugerindo a necessidade de ampliação da investigação sobre seus reservatórios e os meios de transmissão (KLUYTMANS et al., 1995). Em saúde pública se reconhece o risco da presença de MRSA em produtos alimentícios e nos locais de sua produção (KITAI et al., 2004) e, embora o ambiente favoreça a contaminação com esta categoria de bactéria, esta via de transmissão ainda não foi profundamente pesquisada (LEE, 2003) fazendo-se importante a proposta do presente trabalho neste âmbito. Além disso, LIPSITCH et al. (2002) sugerem que mais estudos sejam feitos para se entender o mecanismo dessas aquisições de resistência que os microrganismos apresentam fora dos hospitais, o que pouco se sabe.

1.2 ENTEROTOXINA

1.2.1 Aspectos Gerais das Enterotoxinas Estafilocócicas

Os indivíduos do gênero *Staphylococcus* possuem diversos aspectos de patogenicidade. Apesar de não serem microrganismos esporulados, seus fatores de virulência vão desde exoproteínas mais comuns entre outras bactérias (enzimas e citotoxinas), que atuam no sentido de converter o tecido do hospedeiro em alimento, tais como DNAses, nucleases, proteases, hemolisinas, lipases, hialuronidasas e colagenases, até exoproteínas mais elaboradas e específicas como dito anteriormente. Deste segundo grupo

fazem parte as enterotoxinas estafilocócicas (SE). Todas as categorias de toxinas possuem conhecida capacidade de influir em células do sistema imune. Seu possível primeiro objetivo *in vivo* é o de impedir a resposta imune do hospedeiro, mas muitas delas também possuem uma resposta biológica secundária específica (DINGES et al., 2000; SILA et al., 2009).

A espécie *Staphylococcus aureus* é a principal produtora destes fatores de virulência, seja por quantidade ou por apresentar mais de um fator de virulência simultaneamente (embora outras espécies também os produzam em menor quantidade ou não mais que um fator por vez). Quando presentes em alimentos representam um perigo para saúde pública pela produção de enterotoxinas (SEs) que, se ingeridas em quantidade suficiente, podem causar toxinfecção (MATTOS, 2005; PELES et al., 2007). Sendo o *S. aureus* parte da flora natural do organismo humano e de diversos animais, seja na pele ou no trato respiratório superior, é apenas quando produtos de origem animal ou contaminados com a bactéria por manipulação não são refrigerados da maneira correta que o microrganismo se reproduz e então produz a enterotoxina (PANNEERSEELAN e MURIANA, 2009).

A enterotoxina estafilocócica é altamente resistente ao calor, permanecendo ativa em altas temperaturas. Consegue ficar em média de 3 a 8 minutos a 121°C. Ela é dividida em diversos tipos, sendo alguns mais resistentes que outros. Essa divisão era comumente feita em cinco tipos antigênicos: SEA, SEB, SEC, SED, SEE, porém mais recentemente outros tipos sorológicos foram identificados tais como SEG, SEH, SEI, SEJ, SEK, SEL, SEM, SEN, SEO, SEP, SEQ, SER e SEU. Mesmo assim, as mais comuns em toxinfecções continuam sendo as cinco principais (SEA – SEE), sendo a SEA a responsável pela maioria dos casos de gastroenterites (LETERTRE et al., 2003; BLAIOTTA et al., 2004; FAGUNDES e OLIVEIRA, 2004; LOVSETH et al., 2004; GERMANO PML e GERMANO MIS, 2007; PELES et al., 2007; PANNEERSEELAN e MURIANA, 2009).

A toxinfecção causada pelas enterotoxinas se dá através da ingestão destas nos alimentos. Seus sintomas incluem náusea, grande quantidade de vômito, alteração de pressão arterial, cólicas abdominais e diarreia. Tais sintomas costumam se apresentar de 2 a 8 horas após o consumo do alimento contaminado e são agudos e rápidos suficientes para levar a uma internação hospitalar, mas, em geral, auto-limitados. Outros fatores interferentes são a quantidade de toxina ingerida, a sensibilidade individual à toxina em questão e o estado de saúde do doente (GERMANO PML e GERMANO MIS, 2007; PANNEERSEELAN e MURIANA, 2009; SILA et al., 2009). Estas toxinas são codificadas cada uma por seu devido gene que estão presentes em elementos móveis como plasmídeos, fagos e ilhas de patogenicidade na maioria das vezes (DERZELLE et al., 2009).

Dada sua capacidade de permanecer sem desnaturar em temperatura elevada a prevenção deve ser feita antes que o microrganismo tenha condições de produzi-la, pois, uma vez no alimento, sua eliminação é muito difícil. Sua dose infectante foi reportada sendo aproximadamente 200ng e para produzir esta quantidade de toxina estima-se que seja necessário um número de células infectantes superior a 100.000 (RAJKOVIC et al., 2006; GERMANO PML e GERMANO MIS, 2007; PELES et al., 2007). De fato, a legislação vigente no Brasil define que até certa quantidade de células infectantes o alimento é considerado seguro. Esse valor varia dependendo do tipo de produto, mas, em geral, fica em torno de 5×10^2 e 5×10^3 células por grama de alimento (ANVISA, 2001).

1.2.2 A Concepção de Alimento Seguro

Uma grande discussão que vem sendo abordada nos últimos tempos é a questão que envolve a presença do microrganismo como definição para um alimento seguro ou não ao invés da presença apenas de enterotoxina. Sabe-se que a gastroenterite é causada pela toxina e não pelo *Stahylococcus* em si. O microrganismo pode colonizar a parede estomacal, invadir a corrente sanguínea (principalmente em pessoas debilitadas como já mencionado), mas, no caso de dano direto como a toxinfecção alimentar causada pela ingestão de produtos contaminados, só a presença da bactéria não é determinante para ocorrência ou não do surto (RAJKOVIC et al., 2006). Além disto, a sobrevida em temperaturas elevadas de tal produto faz com que, muitas vezes a toxina esteja presente nos alimentos na ausência do microrganismo (PELES et al., 2007), tornando a presença ou ausência da bactéria como a definição de alimento seguro uma questão discutível.

Esta teoria é comprovada por RAJKOVIC et al. (2006) quando, em um estudo de surto alimentar, foram capazes de detectar a presença da enterotoxina no alimento através de uma técnica que combina uma reação imunológica e um PCR *real time* mesmo que nenhum microrganismo da espécie *S. aureus* tenha sido recuperado do alimento em questão. Desta maneira, os autores propõem que o modo como se lida com a presença destes microrganismos em alimentos, focando na presença da bactéria e não da toxina, deve ser reavaliada.

Essa discussão também levantada pelo FDA (*Food and Drug Administration*), órgão responsável pela segurança alimentar nos EUA, que ressalta que a presença de *S. aureus* no produto para consumo pode representar más condições de higiene do manipulador, porém não é em si prova de que pode originar um surto gastrentérico (BENNETT e LANCETTE,

2001). Para tal, o presente trabalho pretende analisar a presença do gene codificador de uma das enterotoxinas estafilocócicas, a SEA, em alimentos prontos para consumo e peixe cru de feira com a intenção de colocar em debate a questão da presença do microrganismo versus a presença da toxina como definição de alimento seguro.

2 OBJETIVOS

O objetivo geral do trabalho consiste em analisar a resistência fenotípica e a presença do gene de resistência a meticilina (*mecA*) em cepas de *Staphylococcus aureus* isolados de amostras de alimentos para determinar sua presença/ausência em um novo ambiente de transmissão e pesquisar a presença do gene codificador de enterotoxina (SEA) nestas amostras e, a partir disso, discutir a validade de apenas se fiscalizar a presença de qualquer microrganismo do gênero *Staphylococcus* coagulase positivo em produtos alimentares como forma de manter o alimento seguro contra toxinfecções.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Pesquisar a presença do gene codificador de enterotoxina SEA nas amostras identificadas geneticamente como da espécie *S. aureus* (através da PCR com iniciadores específicos para a amplificação do fragmento 16S rDNA).
2. Amplificar fragmentos correspondentes ao gene de múltipla resistência, *mecA*.
3. Realizar o teste fenotípico de resistência a alguns antibióticos beta-lactâmicos.
4. Discutir o significado da provável presença destes genes obtidos para a Saúde Pública e Vigilância Sanitária alimentar.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DO *Staphylococcus aureus*

Foi realizado o reisolamento das cepas da coleção do Laboratório de Saúde Pública em ágar Bird Parker e identificação por coloração de Gram e testes bioquímicos como catalase, manitol e DNase, com confirmação de espécie através da reação de PCR (descrito posteriormente). As amostras previamente coletadas eram provenientes de peixe de feira (2), queijo (7), “sushi/sashimi” (27) e “bentô” (21). Sendo sushi/sashimi e “bentô” exemplares de comida japonesa. O “sushi” é feito com arroz temperado com molho de vinagre combinado com algum tipo de peixe, frutos do mar ou ainda vegetais. “Sashimi” são peixes e frutos do mar muito frescos, fatiados em pequenos pedaços e servidos crus. Os dois tipos de iguarias costumam formar porções juntos. Já o “bentô” é um prato combinado semelhante a uma “marmitta japonesa”. O “bentô” tradicionalmente é feito de arroz, peixe ou carne e legumes cozidos ou em conserva.

3.2 ANTIBIOGRAMA

Foi realizado teste de disco-difusão em ágar Müeller Hinton, segundo os critérios do CLSI (2003), utilizando discos contendo antimicrobianos beta-lactâmicos para medição dos halos de resistência. Os halos considerados sensíveis tinham o teste repetido duas vezes para identificar o real potencial de resistência das cepas e não apenas o imediato. Os

considerados intermediários eram repetidos uma vez a mais para verificar se não eram capazes de se converter em resistente. Os resultados finais como resistente ou intermediário tiveram a cepa final do teste guardada em glicerol a -70°C. Os antibióticos testados foram: Amoxicilina/Ácido Clavulanico (AMC) de 30µg, Piperaciclina/Tazobactam (PIT) de 110µg, Cefalotina (CFL) de 30µg, Cefotetan (CTT) de 30µg, Cefoxetina (CFO) de 30µg, Cefepime (CPM) de 30µg, Imipenem (IMP) de 10µg, Oxacilina (OXA) de 1µg e Vancomicina (VAN) de 30µg. Os halos foram interpretados de acordo com o CLSI (2003).

3.3 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO

Para a extração do material genômico foi utilizado o método Fenol/Clorofórmio descrito por ARAÚJO et al. (2006) com modificações, realizado conforme descrito abaixo:

As cepas foram semeadas em 2mL de caldo Luria 1% e permaneceram em estufa a 35°C, por 24 horas. A seguir, foram centrifugadas a 5000rpm por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante descartado. O *pellet* foi ressuscitado com 1mL de solução tampão TE I (Tris 10mM, pH 8.0; EDTA 1mM, pH 8.0) e o produto transferido para um microtubo de 1,5ml. Novamente o material foi centrifugado a 12000rpm por 5 minutos a 4°C com descarte do sobrenadante. O *pellet* foi ressuscitado novamente com 100µL de solução tampão TE I e adicionado a 100µL de lisozima (10mg/mL). Foram acrescentados 500µl da solução de lise (496,5µl de Tampão F; 3,5µl de β-mercaptoetanol 70mM) e as amostras permaneceram, então, a 65°C por 1 hora. Em seguida, foram adicionados 20µL de solução de proteinase K (20mg/mL) a cada tubo, que foram novamente colocados em banho a 65°C por 1 hora, e, então, foi acrescentado 500µl da solução de extração (250µL fenol + 240µL clorofórmio + 100µL álcool iso-amílico) a cada tubo com amostra. Todo conteúdo dos microtubos de

1,5mL foi transferido a um microtubo *phase lock ligh* (eppendorf®) e mais uma vez as amostras foram centrifugadas a 12000rpm por 5 minutos a 4°C. A fase superior resultante foi transferida para um novo microtubo de onde foram acrescentados 5µl de RNase e as amostras incubadas a 37°C por 1 hora. Após o tempo determinado, 500µl de clorofórmio foram acrescentados e, em seguida, homogeneizados vigorosamente. Novamente o resultante foi centrifugado a 12000rpm por 15 minutos a 4°C. A fase aquosa superior obtida foi transferida para um novo microtubo, onde foram adicionados 500µl de isopropanol. As amostras ficaram por 10 minutos no gelo e depois foram suavemente misturadas por inversão para precipitação do DNA. Novamente foram centrifugadas a 12000rpm por 3 minutos a 4°C e o sobrenadante descartado. Em seguida, 500µL de etanol 70% foi adicionado em cada amostra. As amostras foram centrifugadas uma última vez a 12000rpm por 3 minutos a 4°C com sobrenadante descartado. Os tubos foram colocados sob vácuo para secagem do sedimento de DNA. O DNA foi, então, eluído com 50µL do tampão TE II (Tris 10mM, pH 8.0; EDTA 0,1mM, pH 8.0) e armazenado a 4°C até a utilização na amplificação pela reação em cadeia pela polimerase.

3.4 AMPLIFICAÇÃO DO DNA

Os fragmentos de DNA (tanto para identificação específica, quanto para procura dos genes de enterotoxina e resistência) foram amplificados por PCR com iniciadores específicos. Para cada 25µL de reação foram utilizados 5µL de DNA (50µg/µL); 2,5µL de tampão 10x; 1,5mM de cloreto de magnésio; 0,2µL de solução DNTP 25mM; 0,4µM de cada iniciador, 1,25U de polimerase termoestável (Taq-polimerase) e água MilliQ® suficiente para completar o volume para 25µL. O Quadro 1 apresenta os iniciadores usados para as reações.

Para amplificação com os iniciadores de identificação de *Staphylococcus aureus* pela amplificação do fragmento 16S do rDNA (Quadro 1), foi empregado um ciclo inicial a 95°C por 5 minutos; 30 ciclos compreendendo desnaturação a 95°C por 1,5 minutos, anelamento a 55°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 2 minutos; e um único ciclo de extensão final a 72°C por 5 minutos e manutenção a 4°C até a retirada do termociclador (MASON et al., 2001, modificado por MATTOS, 2005) (Quadro 2).

Com os iniciadores para o gene de resistência (Quadro 1) foi empregado um ciclo inicial de 95°C por 5 minutos; 40 ciclos compreendendo desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 55°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto; e um único ciclo de extensão final a 72°C por 5 minutos e manutenção a 4°C até a retirada do termociclador (LEE, 2006) (Quadro 2).

Já para o gene da enterotoxina SEA, também foram utilizados iniciadores específicos (Quadro 1) e se empregou um ciclo inicial de 94°C por 2 minutos; 30 ciclos compreendendo a desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 50°C por 1 minuto, extensão a 72°C por 3 minutos; e um único ciclo de extensão final a 72°C por 5 minutos e manutenção a 4°C até a retirada do termociclador (KONG et al., 1995 modificado por MATTOS, 2005) (Quadro 2).

Para a amplificação da região 16S do rDNA na identificação específica como *Staphylococcus aureus*, deve-se obter um fragmento de 800pb para resultado positivo. Na amplificação do gene codificador da toxina SEA, um fragmento de 480pb é considerado positivo e para a amplificação do gene *mecA* o fragmento para resultado positivo é de 280pb (Quadro 2).

Como controle positivo para o gene de resistência foi utilizada a cepa N315, uma cepa *mecA* positiva de SCCmec tipo II cedida pelo Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, descrita previamente por ITO et al. (2001). Para as demais foram utilizados como controles positivos cepas já verificadas como positivas por MATTOS (2005) para ambas as reações.

Quadro 1. Iniciadores para identificação de *Staphylococcus aureus*, pesquisa do gene de resistência *mecA* e do gene codificador da enterotoxina (SEA) e suas referências:

Função	Iniciadores	Seqüências nucleotídicas	Referência
Identificação específica	SA 16S F	5' CCTATAAGACTGGGATAACTTCGGG 3'	MASON et al., 2001
	SA 16S R	5' CTTTGAGTTTCAACCTTGCGGTCG 3'	
Gene <i>mecA</i>	MecA F	5' TGCTATCCACCCTCAAACAGG 3'	OKUMA et al., 2002
	MecA R	5' AACGTTGTAACCACCCAAGA 3'	
Gene <i>sea</i>	SEA F	5' GCTAGACGGTAAACAAAATAC 3'	KONG et al., 1995
	SEA R	5' TTCAGTAATGCCACCATAGGC 3'	

Quadro 2. Ciclo inicial, temperatura e tempo de cada ciclo, extensão final e tamanho do fragmento para as reações de PCR de cada iniciador*

Iniciadores	PCR						Tamanho do fragmento
	Ciclo Inicial	Número de ciclos	Desnaturação	Anelamento	Extensão	Extensão final	
SA 16S F	95°C 7 min	40	95°C 2 min	50°C 1 min	72°C 1.5 min	72°C 5 min	800pb
SA 16S R							
SAE F	94°C 2 min	30	94°C 35s	56°C 35s	72°C 1min		480bp
SAE R							
MecA F	95°C 5 min	40	95°C 30s	50°C 1 min	72°C 2 min		280pb
MecA R							

* KONG et al., 1995; MASON et al., 2001e OKUMA et al., 2002

3.5 VISUALIZAÇÃO E ANÁLISE DOS PRODUTOS DA PCR

O produto final da amplificação de cada cepa foi separado por meio de eletroforese em gel de agarose, em intensidade de corrente de 6V/cm por um período de 1 hora. Os perfis foram corados com Brometo de Etídio e visualizados em sistema de aquisição de imagens Epi Chemi II Darkroom (UVP) e o software Labworks (UVP).

Foi verificado se as bandas obtidas no gel correspondiam ao tamanho das bandas de genes de identificação, enterotoxina e resistência, descritos na literatura por comparação com marcador de peso molecular de 100pb (Fermentas®). As amostras que apresentaram tais bandas foram consideradas positivas.

3.6 PURIFICAÇÃO DO “AMPLICON” E SEQUENCIAMENTO DO FRAGMENTO PARA AS CEPAS POSITIVAS PARA *mecA*

Foi realizada a purificação do “amplicon” pelo protocolo do Kit de purificação “*GFX PCR DNA and gel Band Purification Kit*” da *GE Health Care* da seguinte forma: uma reação de PCR foi feita em duplicata e o material colocado em um microtubo de 1,5mL. Foram adicionados 500µL de “*capture buffer*” e homogeneizou-se por 1 minuto. Este produto foi aplicado sobre uma coluna em um tubo coletor e centrifugado por 1 minuto a 13000rpm. Descartou-se o material do tubo coletor e foram adicionados 500µL de “*wash buffer*”. O material foi centrifugado novamente por 1 minuto a 13000rpm. Descartou-se o depositado no tubo coletor e a coluna foi transferida para um microtubo 1,5mL. Adicionou-se sobre a coluna 30µL de “*elution buffer*” e novamente o produto foi centrifugado por 1

minuto a 13000rpm. Uma quantidade de 5mL dos “amplicons” purificados adicionado a 0,2µl da solução estoque de primer específico para o gene *mecA* e 5,8µl de água de injeção foram encaminhados para o seqüenciamento. As seqüências resultantes foram alinhadas manualmente contra seqüências disponíveis no banco de dados *GenBank* (www.ncbi.nih.gov/genbank) por meio do sistema BLAST (*Basic Local Alignment and Search Tool*). Para comparação das seqüência utilizou-se a seqüência de um *S. aureus mecA* positivo: ATCC33591 (SAKOULAS et al., 2004).

4 RESULTADOS

4.1 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DO *Staphylococcus aureus*

Cinquenta e sete cepas já registradas como amostras de alimentos e provenientes da coleção de cultura do Laboratório de Prática em Saúde Pública foram confirmadas fenotipicamente como *Staphylococcus aureus*. Todas foram isoladas em ágar Bird Parker, triadas quanto à produção de catalase e DNase, característica sob coloração de Gram, fermentação de manitol e crescimento em meio com maior concentração de sal para confirmação fenotípica da espécie. A Figura 1 demonstra o crescimento em meio salino e fermentação do manitol do meio. Nem todos os resultados fenotípicos indicativos de *S. aureus* eram apresentados simultaneamente, porém, esta etapa forneceu uma triagem inicial para a identificação específica por PCR. O Quadro 3 apresenta todos resultados das análises, incluindo estes testes fenotípicos.

A reação de PCR com os iniciadores específicos para região 16S do rDNA genômico gerou em todas as cinquenta e sete cepas “amplicons” com 800pb específicos para *S. aureus*. Tal fato foi verificado em gel de agarose de 1,2% em comparação ao marcador de peso molecular. A Figura 2 apresenta um exemplo de um gel de agarose com cepas que amplificaram o fragmento, ou seja, são positivas para a espécie em questão e cepas que não o amplificaram.

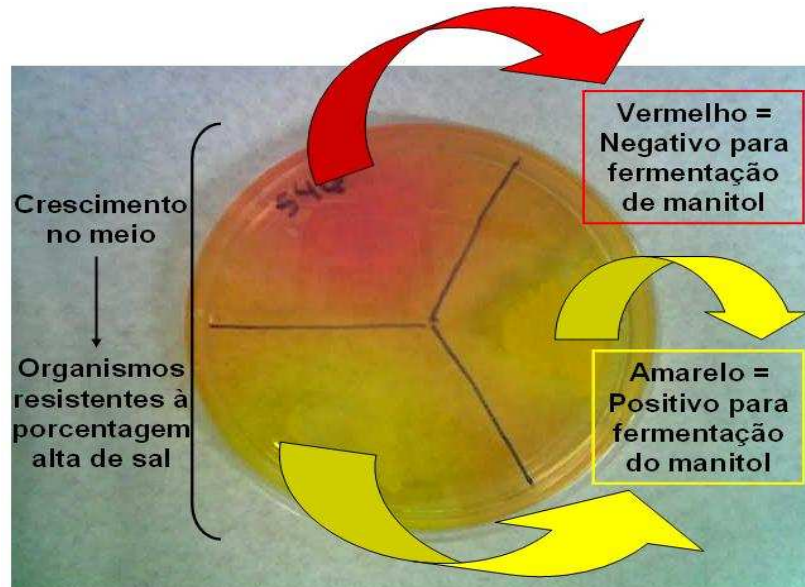


Figura 1. Teste em meio ágar Manitol.

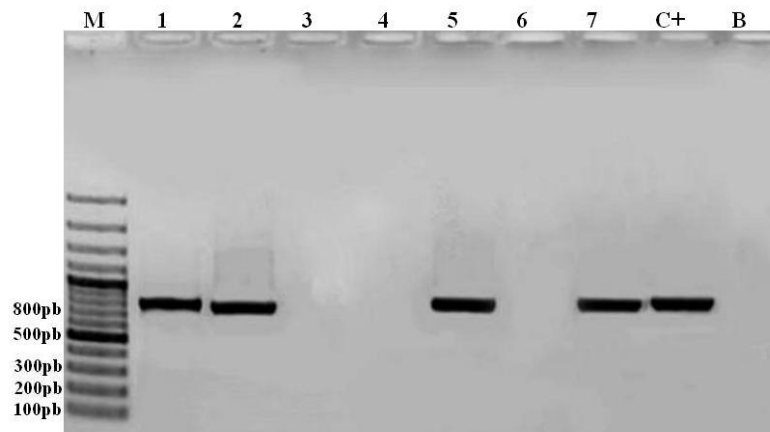


Figura 2. Gel de Agarose 1,2% com resultado da amplificação da região 16S do rDNA para identificação genotípica da espécie *S. aureus*. As bandas correspondem ao “amplicon” da região selecionada do rDNA 16S com 800pb, confirmando a espécie nas amostras 1, 2, 5, 7 e no controle positivo (C+) e com resultado negativo nas amostras 3, 4, 6 e no controle negativo ou branco (B). As posições das bandas foram comparadas em relação ao marcador de peso molecular de 100 pb (Fermentas®) (M).

Quadro 3. Resultados dos testes fenotípicos de identificação e resistência e genotípicos da procura dos genes *mecA* e *sea* em 57 amostras de *S. aureus* de origem alimentar.

Amostras	Testes Fenotípicos					Genes	
	Gram	Catalase	Manitol	DNase	Resistência	<i>mecA</i>	<i>sea</i>
FSP301/09	+	+	Cresc/AM+	+	0	-	+
FSP302/09	+	+	Cresc/AM+	+	0	-	-
FSP303/09	+	+	Cresc/AM+	+	OXA (I)	-	+
FSP304/09	+	+	Cresc/AM+	+	0	-	-
FSP305/09	+	+	Cresc/AM+	+	0	-	+
FSP306/09	+	+	Cresc/AM+	+	0	-	+
FSP307/09	+	+	Cresc/AM+	+	0	-	+
FSP308/09	+	+	Cresc/AM+	+	0	-	+
FSP309/09	+	+	Cresc/AM+	+	0	-	+
FSP310/09	+	+	Cresc/AM-	+	0	+	+
FSP544/09	+	+	Cresc/AM-	+	0	-	+
FSP546/09	+	+	Cresc/AM-	+	0	-	-
FSP547/09	+	+	Cresc/AM+	+	CPM, CFO, CTT	-	-
FSP550/09	+	+	Cresc/AM+	-	0	-	-
FSP551/09	+	+	Cresc/AM+	-	CPM, CFO	-	-
FSP553/09	+	+	Cresc/AM+	-	0	-	-
FSP554/09	+	+	Cresc/AM-	+	0	-	-
FSP555/09	+	+	Cresc/AM+	+	0	-	+
FSP557/09	+	+	Cresc/AM+	-	0	-	-
FSP558/09	+	+	Cresc/AM+	+	0	-	+
FSP559/09	+	+	Cresc/AM+	+	0	-	-
FSP560/09	+	+	Cresc/AM+	+	0	-	-
FSP561/09	+	+	Cresc/AM+	+	0	-	+
FSP566/09	+	+	Cresc/AM+	-	0	-	-
FSP565/09	+	+	Cresc/AM+	-	0	-	-
FSP564/09	+	+	Cresc/AM+	-	0	-	-
FSP563/09	+	+	Cresc/AM-	-	0	-	-
FSP562/09	+	+	Cresc/AM+	+	0	-	-
FSP602/09	+	+	Cresc/AM+	-	0	-	-
FSP603/09	+	+	Cresc/AM+	-	0	-	-
FSP604/09	+	+	Cresc/AM+	-	0	-	-
FSP606/09	+	+	Cresc/AM+	-	0	-	+
FSP610/09	+	+	Cresc/AM+	-	0	-	-
FSP613/09	+	+	Cresc/AM+	-	CPM, OXA	-	-
FSP615/09	+	+	Cresc/AM+	-	0	-	-
FSP616/09	+	+	Cresc/AM-	-	0	-	-
FSP617/09	+	+	Cresc/AM-	-	0	+	-
FSP618/09	+	+	Cresc/AM-	-	0	-	-
FSP619/09	+	+	Cresc/AM-	-	0	-	-
FSP620/09	+	+	Cresc/AM-	-	0	-	-
FSP621/09	+	+	Cresc/AM-	-	0	-	-
FSP622/09	+	+	Cresc/AM+	+	0	-	-
FSP623/09	+	+	Cresc/AM+	-	0	+	-
FSP624/09	+	+	Cresc/AM+	-	0	+	-
FSP697/09	+	+	Cresc-	-	CPM	-	-
FSP698/09	+	+	Cresc/AM+	+	0	-	-
FSP700/09	+	+	Cresc/AM+	-	0	-	-
FSP356/09	+	+	Cresc/AM+	-	OXA	-	-
FSP354/09	+	+	Cresc/AM+	+	0	-	-
FSP355/09	+	+	Cresc/AM+	-	0	-	-
FSP629/09	+	+	Cresc/AM+	+	0	-	-
FSP357/09	+	+	Cresc-	+	0	+	-
FSP631/09	+	+	Cresc/AM+	+	0	-	-
FSP358/09	+	+	Cresc/AM+	+	0	-	-
FSP359/09	+	+	Cresc/AM+	+	0	-	-
FSP360/09	+	+	Cresc/AM+	+	0	-	-
FSP361/09	+	+	Cresc/AM+	+	0	-	-

Notas do Quadro 3:

“Cresc” indica que houve crescimento no meio de manitol salino;

“Cresc-” indica a ausência de crescimento no meio manitol salino;

“AM+” indica que houve mudança da coloração do meio para amarelo;

“AM-” indica que não houve mudança na coloração.

“OXA” representa Oxacilina, “COM” representa cefepime, “CFO” representa cefoxetina e

“T” representa resistência intermediária.

4.2 PESQUISA DOS GENES *mecA* E *sea*

4.2.1 Gene *sea*

Das cinquenta e sete amostras, treze (22,8%) apresentaram a banda de 480pb e foram consideradas como portadoras do gene codificador da enterotoxina SEA. A Figura 3 apresenta um exemplo de um gel de agarose com bandas de 480pb para as cepas que amplificaram o gene de enterotoxina SEA, ou seja, são positivas para a presença do gene e cepas que não o amplificaram, sendo estas negativas.

Das que apresentaram o gene, onze (19,2%) são provenientes de amostra de “bentô” (FSP303/09, FSP305/09, FSP306/09, FSP307/09, FSP308/09, FSP309/09, FSP310/09, FSP544/09, FSP555/09, FSP558/09, FSP561/09), uma (1,8%) de amostra de peixe (FSP301/09) e uma (1,8%) de “sushi/sashimi” (FSP606/09) (Quadro 3). As amostras provenientes de queijo e de dieta hospitalar não tiveram nenhum resultado positivo para o gene codificador da toxina. Na Tabela 1 estão dispostas quantas cepas apresentaram o gene da enterotoxina em cada categoria de amostra, tal qual o de resistência e a resistência fenotípica à Oxacilina.

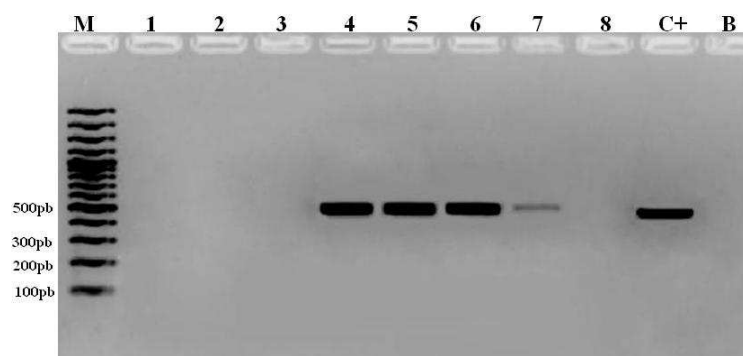


Figura 3. Gel de Agarose 1,2% com resultado da amplificação do gene codificador da enterotoxina SEA. As bandas correspondem ao “amplicon” de 480pb do gene específico, indicando as cepas positivas (4, 5, 6, 7) e o controle positivo (C+) e a ausência de bandas nas amostras negativas (1, 2, 3 e 8) e no controle negativo ou branco (B). As posições das bandas foram comparadas em relação ao marcador de peso molecular de 100pb (Fermentas®) (M).

Das amostras de “bentô”, que continham vinte e uma cepas, e de peixe de feira que continha apenas duas cepas, metade das amostras de cada uma das origens de alimento (50% para o peixe de feira e 52,4% no caso do “bentô”) apresentaram o gene *sea*. No caso do “sushi/sashimi” que continha vinte e sete cepas, amostras positivas representaram aproximadamente 3,7% (Tabela 1).

Tabela 1. Quantidade de cepas positivas para gene de enterotoxina (*sea*), para o gene *mecA* e para resistência fenotípica à Oxacilina (OXAR) por tipo de amostra de alimento.

Tipo de amostra	Gene <i>sea</i>	Gene <i>mecA</i>	OXAR	Total
Peixe cru de feira	1	0	1	2
“bentô”	11	1	0	12
“sushi/sashimi”	1	3	2	6
Queijo	0	1	0	1
Total	13	5	3	21

4.2.2 Gene *mecA*

Com relação ao gene de resistência *mecA*, das 57 amostras testadas, cinco (8,8%) apresentaram o fragmento de 280pb, sendo consideradas positivas para a presença do gene *mecA*. A Figura 4 apresenta um exemplo de um gel de agarose com bandas de 280pb para as cepas que amplificaram o gene *mecA*, ou seja, são positivas para a presença deste gene, e cepas que não o amplificaram, portanto, negativas. Das positivas, uma (1,8%) representava amostra de queijo (FSP357/09), uma (1,8%) de “bentô” (FSP310/09) e três (5,2%) de “sushi/sashimi” (FSP617/09, FSP623/09 e FSP624/09) (Quadro 3).

Dentre as amostras de queijo, a cepa positiva para o gene *mecA* representa 12,5% (01) do total das amostras deste tipo de alimento. Já para as amostras de “bentô” a porcentagem positiva para o gene é de 4,8% (01) das cepas e, das amostras de “sushi/sashimi”, a porcentagem positiva é de 11,1% (03) das amostras (Tabela 1).

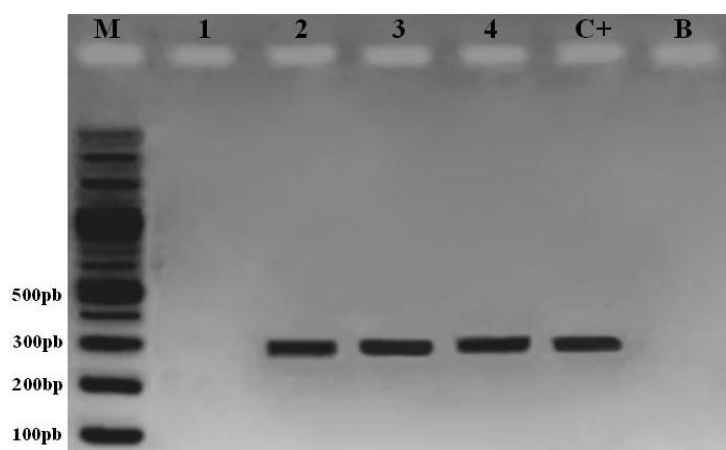


Figura 4. Gel de Agarose 2% com resultado da amplificação do gene *mecA*. As bandas correspondem ao “amplicon” de 280pb do gene específico, indicando as cepas positivas (2, 3 e 4) e o controle positivo (C+) e a ausência de bandas nas amostras negativas (1) e no controle negativo ou branco (B). As posições das bandas foram comparadas em relação ao marcador de peso molecular de 100pb (Fermentas®) (M).

Além disso, uma única cepa de toda a amostragem apresentou ambos genes de resistência *mecA* e enterotoxina SEA positivos. Esta cepa se refere à amostra de “bentô” (FSP310/09) (Quadro 3).

4.3 SEQUENCIAMENTO DOS GENES *mecA*

As cinco amostras positivas para o gene *mecA* tiveram seus “amplicons” seqüenciados e alinhados manualmente contra seqüências disponíveis no banco de dados *GenBank*. Todas as seqüências apresentaram 100% de similaridade com a seqüência do gene *mecA* da cepa ATCC 33591 (SAKOULAS et al., 2004) disponível no banco de dados. A Figura 5 demonstra a seqüência analisada nas cepas positivas e na cepa controle.

4.4 RESISTÊNCIA FENOTÍPICA

Na resistência fenotípica em teste de disco difusão, duas cepas apresentaram o fenótipo resistente à oxacilina (FSP613/09 e FSP356/09) e uma o fenótipo intermediário (FSP303/09) que, neste caso, por ser igualmente preocupante, é considerado como resistente (Quadro 3). Sendo as duas cepas resistentes provenientes de amostras de “sushi/sashimi” e a intermediária de peixe de feira (Tabela 1). A Figura 6 representa um exemplo de uma das placas de teste positivo para resistência fenotípica para oxacilina em disco-difusão.

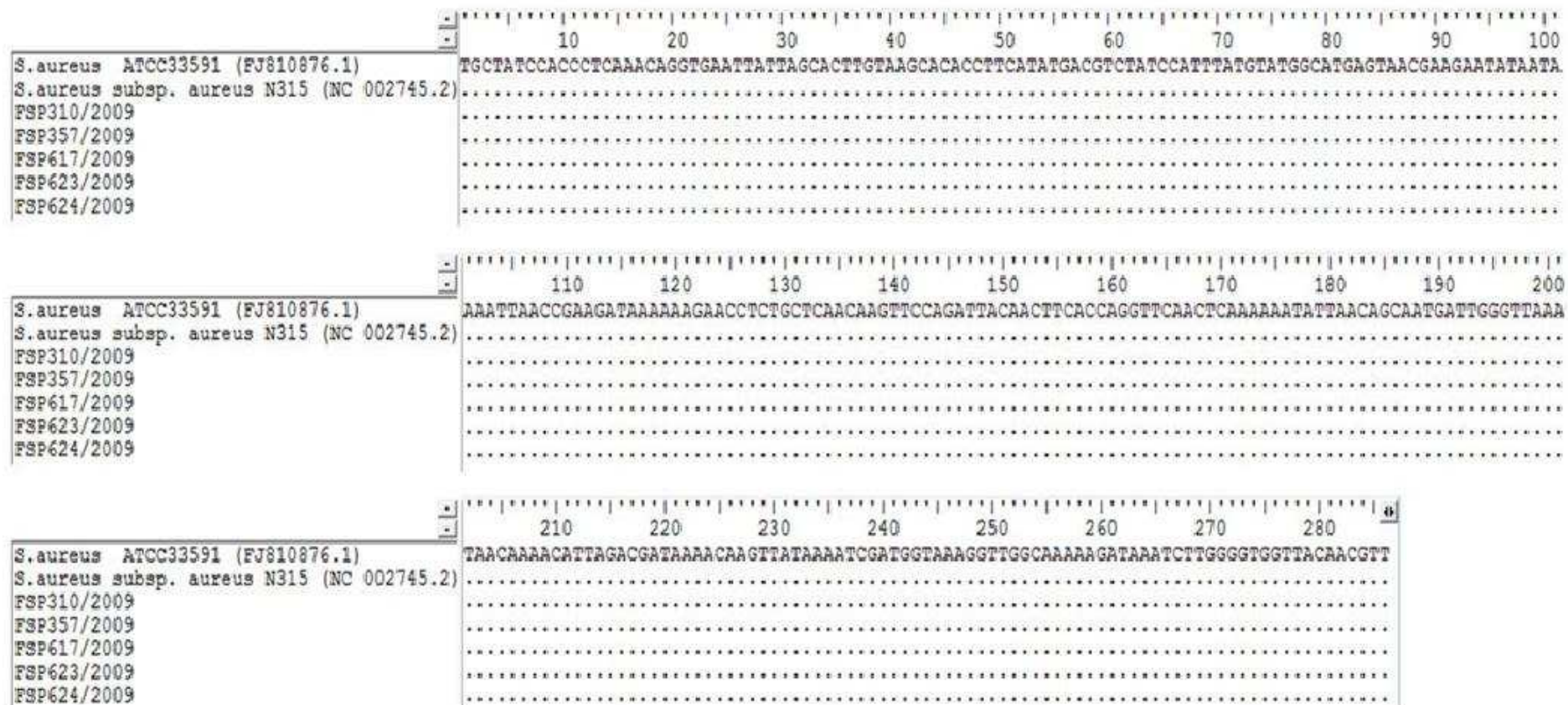


Figura 5. Sequencia obtida dos “amplicons” resultantes da reação de PCR para o gene *mecA* e do controle positivo ATCC33591 usado na comparação (SAKOULAS et al., 2004).

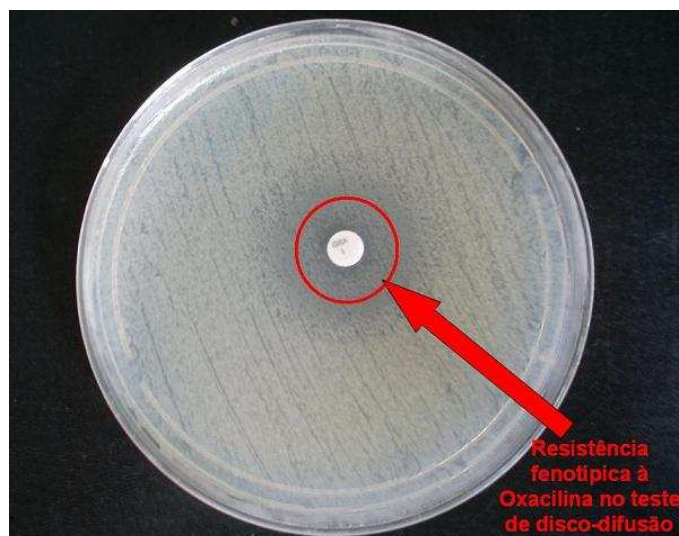


Figura 6. Imagem de uma placa de petri com cepa resistente à Oxacilina (1 μ g) no teste de disco-difusão em ágar Mueller Hinton.

Já em relação aos outros antibióticos beta-lactâmicos, poucas amostras apresentaram alguma resistência. Uma amostra (FSP547/09) se mostrou resistente a três antibióticos: cefepime (CPM), ceftazidima (CFO) e cefotetan (CTT). Uma amostra (FSP551/09) se mostrou resistente a dois antimicrobianos: cefepime (CPM) e ceftazidima (CFO). A amostra FSP613/09, além da resistência à Oxacilina, também se mostrou resistente à cefepime (CPM). E a amostra FSP697/09 obteve resultado de resistente apenas a cefepime (CPM) (Quadro 3).

5 DISCUSSÃO

Não só no caso da metilina/oxacilina, outros diversos antibióticos também apresentam o problema da crescente resistência adquirida pelos microrganismos (LIPSITCH e SAMORE, 2002). Porém, os antibióticos beta-lactâmicos são um dos mais importantes devido a seu amplo uso, principalmente na medicina veterinária. Na Dinamarca, por exemplo, foi o agente mais prescrito em 2007 (LI et al., 2007).

Acredita-se que os *Staphylococcus* coagulase negativos sejam reservatórios e foram os primeiros a transferir o complexo mec para um *S. aureus*, já que é provado que existe transmissão deste gene entre espécies do gênero (HIRAMATSU, 1995). Por isso a presença do gene *mecA* mesmo que em cepas do gênero *Staphylococcus* coagulase negativas é um risco epidemiológico para a propagação desta resistência. Como não se verifica a presença de indivíduos do gênero *Staphylococcus* coagulase negativos em alimentos, o gene pode estar se perpetuando através destes microrganismos na via alimentar. A presença do *mecA* mesmo que em poucas amostras neste trabalho já denota um risco, uma vez que eles podem ser transferidos em uma troca gênica para os *Staphylococcus* coagulase negativos que os armazenariam até que *S. aureus* acabassem os readquirindo.

A discrepância entre os resultados fenotípicos e genotípicos no presente estudo já era esperada uma vez que o complexo mec conservado exibe sensibilidade fenotípica mesmo na presença do *mecA* até que seus inibidores sofram alguma alteração. De fato, WELLER (1999) já havia descrito que os microrganismos efetivamente resistentes teriam mutações em seu gene *mecI* ou na região operadora onde a proteína repressora tem afinidade, que se localiza no promotor do gene *mecA*. Afirma, ainda, que existam outras possibilidades para a

expressão da proteína modificada, como a ausência total do gene *mecI*. O autor encontrou *mecI* em 52% das amostras positivas de MRSA, enquanto o *mecR1* estava presente em 100% dessas e, 6 amostras de um total de 21, apresentavam as substituições nucleotídicas no gene repressor resultando em um códon de finalização da proteína no meio da sequência de bases. Este mesmo tipo de situação já havia sido verificado em outros estudos na Europa. Mesmo em amostras em que não se encontravam o gene *mecI* ou *mecR1*, pelo menos a região 5' do segundo, em 40% das amostras, se conservava. Tal fato mostra que os genes reguladores aparentemente são componentes originais do complexo e que, por isto, sugerem que a aquisição do gene *mecA* junto com seus reguladores seja o primeiro passo na evolução genética do MRSA (HIRAMATSU, 1995).

Um fator adicional a ser lembrado é que bactérias expostas a intemperismos ambientais tendem a fazer modificações fenotípicas ou genotípicas para se adaptarem aos efeitos do estresse causado. Os métodos usados atualmente para controlar crescimento bacteriano em alimentos baseiam-se nos mesmos princípios. Estes podem causar modificações em microrganismos presentes em produtos alimentícios e levar à produção de proteínas de choque (que previnam estresse semelhante futuro) ou ainda, uma “proteção cruzada” a outros tipos de estresse, incluindo a resistência aos antibióticos (MCMAHON et al., 2006). Como o tempo de reprodução bacteriano é extremamente rápido, muitas gerações podem ser formadas em curto intervalo de tempo, propiciando a adaptação evolutiva (RANG et al., 2001). Isso é demonstrado por MCMAHON et al. (2006) em um estudo que constatou que microrganismos, incluindo *S. aureus*, tiveram suas CIMs (concentração inibitória mínima) aumentadas para alguns antibióticos em condições de estresse como presença de sal ou ácido. Assim, produtos alimentícios são um ambiente favorável para essa adaptação, sendo apenas a presença do gene *mecA*, e não necessariamente sua expressão imediata, fator de preocupação nesta via de transmissão, como reportado neste trabalho.

As condições de teste em laboratório atribuem condições ambientais, como pH, sal, temperatura, entre outros, diferentes das originais que pode interferir na produção da PBP 2a, levando a uma detecção fenotípica enviesada deste patógeno em específico. Além disto, ainda pode existir uma expressão heterogênea onde a população bacteriana é composta por subpopulações que expressam graus diferentes de resistência aos antibióticos (MOHANASOUNDARAM e LALITHA, 2008). OKUMA et al. (2002) ao tentarem diferenciar C-MRSA e H-MRSA, concluíram que o antibiograma não pode ser considerado um teste discriminatório. Nem a expressão fenotípica da resistência e nem mesmo informações epidemiológicas podem separá-los, apenas a análise molecular, como é corroborado neste trabalho pela presença de organismos com o gene de resistência não exibindo a resistência fenotípica no teste de disco-difusão.

A quase total maioria dos organismos que apresentaram o gene *mecA* neste trabalho não se mostraram fenotipicamente resistentes à oxacilina nem a outros antibióticos beta-lactâmicos. Isto pode ser explicado pela provável natureza intacta dos genes reguladores e a formação original da região *mec* que mantém o gene codificador da proteína diferenciada inativo até uma possível necessidade de adaptação da bactéria. Contudo, sem estabelecer exatamente as condições de todo o complexo *mec* não se pode afirmar com certeza que a regulação ocorreu no nível de seu DNA. Diversos outros mecanismos são adotados pelos microrganismos para regular uma atividade metabólica desde sua transcrição até a própria proteína. A regulação pode ocorrer desde o próprio mecanismo repressor/regulador dos genes *mecI* e *mecR1* na transcrição da proteína PBP2a, na tradução desta (principalmente no caso dos procariotos onde transcrição e tradução ocorrem praticamente simultaneamente) ou até mesmo na própria proteína (GOUDREAU e STOCK, 1998; GOLLNICK E BABITZKE, 2002; BRANTL, 2004; DEUTSCHER, 2006)

Além disso, a proteína MecR1 que é responsável por enviar o sinal para a célula de que existe antibiótico no meio também pode sofrer ela própria toda essa gama de regulação. Sem a capacidade de perceber a droga externamente ou de mandar o sinal através dos domínios citoplasmáticos para agirem na regulação do DNA para que a bactéria produza a proteína de membrana modificada, o MRSA não apresentaria resistência. Porém, este mecanismo possui uma particularidade que deixa menos provável sua interferência na não correspondência fenótipo e genótipo: o complexo mec também pode ser regulado pela proteína BlaR1 (reguladora primeiramente do complexo bla de produção da beta-lactamase) dado suas semelhanças moleculares quando o gene *mecR1* ou a proteína correspondente não estão presentes ou funcionais (CHA et al., 2007).

Apenas uma cepa apresentou o fenótipo intermediário de resistência. Este fato se dá provavelmente pelos mesmos meios de regulação descritos acima, onde o microrganismo ainda não teria atingido o potencial de produção da proteína PBP 2a somado ao fator da heterogeneidade de expressão que poderia mascarar o resultado final (HIRAMATSU, 1995 MCCALLUM et al., 2010).

Já os indivíduos que apresentaram resistência fenotípica sem o gene *mecA* podem tê-lo feito por outro mecanismo. O mais provável é a uma substituição de aminoácido na região responsável pela transpeptidação de parede da proteína PBP normalmente produzida. Isto já foi relatado em cepas que não continham o gene *mecA*, porém exibiam uma resistência fenotípica intermediária à oxacilina (NADARAJAH et al., 2006; MCCALLUM et al., 2010). Outro evento já relatado que pode levar a uma resistência fenotípica a essas drogas sem a presença do gene *mecA* é uma super expressão da enzima beta-lactamase produzida por *blaZ*. Essa super expressão estaria relacionada com mais eventos regulatórios além do envolvimento do gene *blaZ* para ocasionar essa resistência (MONTANARI et al., 1996). Ambos os eventos são descritos apenas para resistência intermediária, porém existe a

possibilidade de uma soma de diversos fatores: uma PBP alterada no próprio gene intrínseco, super expressão de beta-lactamase, outros fatores regulatórios e a existência de heterogeneidade de expressão onde uma subpopulação se tornou predominante no momento do teste fenotípico. Além disso, outros fatores desconhecidos podem também estar envolvidos no processo.

De qualquer forma, a resistência expressa fenotipicamente é geralmente instável e varia de acordo com a situação, exceto quando o benefício de manter um mecanismo de resistência sempre operante não seja maior em relação ao custo de energia. Na maioria das vezes, apenas nos momentos de pressão seletiva os genes de resistência são expressos, como na presença de antibióticos (MCCALLUM et al., 2010). Contudo, a presença do gene *mecA* mesmo que inativo ainda é de grande preocupação, pois é um fator mais diretamente relacionado a uma resistência de manejo complicada.

NORMANO et al. (2007a) observaram resistência a algum antibiótico na maioria dos *S. aureus* de produtos derivados de leite, muito provavelmente, pela relação entre a mastite bovina e a bactéria. Neste trabalho apenas uma das cepas de queijo, que representavam aqui um derivado de leite, apresentou o gene de resistência. Apesar de ser um número pequeno, correspondendo a 1,7% do total, já pode ser um indicativo desta relação. Talvez um número maior de amostras de derivados lácteos mostraria uma relação mais próxima do real. Todavia, a maioria dos genes *mecA* foi encontrada em amostras de “sushi/sashimi”, que possui grande potencial de contaminação graças a extensa manipulação pré consumo e nenhum cozimento posterior, mostrando o importante papel da manipulação de alimentos na via de transmissão de MRSA.

KLUYTMANS (2010) fez uma análise da presença de MRSA em produtos alimentícios. Um dos problemas apontados foi a tolerância na legislação de muitos países,

como o caso do Brasil, a certa quantidade de *S. aureus* nos alimentos prontos para consumo, e o fato de que isto não é visto como um risco para saúde pública. Ele aponta, ainda, os diversos riscos da presença deste tipo de patógeno em alimentos e como este fato é atualmente reconhecido e atualmente começa a ser visto como um problema a ser avaliado.

Já o caso do gene codificador da enterotoxina SEA, a grande maioria foi encontrada em amostras de “bentô”. Isso se deve possivelmente à manipulação por um único manipulador que albergava estas cepas com genes de enterotoxina. O fato de serem quase todas as cepas da mesma categoria de alimento pode indicar que a manipulação por uma mesma pessoa tenha contaminado diversas amostras. Apenas um “*fingerprint*” do perfil genético poderia nos mostrar a real origem das cepas: se são realmente diferentes ou se podem ter sido originadas de um mesmo microrganismo e então disseminadas para diversas amostras.

O caso da única cepa portadora do gene em peixe e “sushi/sashimi” também se deve provavelmente à manipulação. No caso da comida japonesa pelo mesmo fator abordado para o gene *mecA*: grande manipulação pré consumo sem cozimento posterior. No caso do peixe, lembrando que não é um reservatório de grande importância a não ser após manipulação, o fato de estar em ambiente aberto com pessoas ao redor (como é o caso de feiras livres) e a manipulação dos vendedores seria uma explicação. De fato, GERMANO PML e GERMANO MIS (2007) afirmam que qualquer ambiente freqüentado por seres humanos é passível de se tornar um reservatório do microrganismo. Essa afirmação demonstra mais ainda a capacidade que a via alimentar tem de disseminar estes genes já que a bactéria não se comporta de maneira diferente por ser resistente. Da mesma forma que se portam os *S. aureus* em geral, também o fazem os portadores de genes de virulência e resistência (CIMOLAI, 2008).

As enterotoxinas podem ter efeitos potentes mesmo em quantidades muito pequenas. Apesar de esta quantidade ser diferente de um gênero a outro de SE. Por exemplo, a SEA foi causadora de um surto em uma escola infantil, em 850 crianças, devido a sua presença em leite achocolatado na quantidade de 0.5 to 0.75 ng/ml. Acrescenta-se ao problema o fato de que nem sempre surtos com enterotoxinas estão relacionados à presença de células viáveis da bactéria (PANNEERSEELAN e MURIANA, 2009). Somado a isto, PANNEERSEELAN e MURIANA (2009) apontam que nem todo teste é capaz de detectar uma quantidade tão pequena de toxina. A melhor forma de se determinar a presença da toxina seria na sua fonte, no caso, o gene codificador.

Como já mencionado neste trabalho, existe uma discussão atual que aborda se apenas a presença do microrganismo deve ser considerada como potencial de toxinfecção. Devido ao fato da gastroenterite ser causada apenas pela presença da toxina e não pelo organismo em si, a capacidade do organismo encontrado no alimento produzir tal proteína deve ser levada em conta (RAJKOVIC et al., 2006). Além disto, a sobrevivência em temperaturas elevadas de tal produto faz com que, muitas vezes ela esteja presente nos alimentos na ausência do microrganismo (PELES et al., 2007).

De fato, como abordado anteriormente, RAJKOVIC et al. (2006) foram capazes de detectar a presença da enterotoxina no alimento através de uma técnica diferenciada mesmo que nenhum *S. aureus* estivesse presente. Porém, os autores sublinham que os métodos utilizados para detecção da proteína em si são difíceis de serem aplicados nas amostras alimentares e pouco precisos. Ainda, podem deixar passar despercebidas pequenas quantidades de toxina, e por isto, inclusive, a dose infectante possa até ser mais baixa do que se informa.

Uma saída seria a identificação da presença de cepas de *S. aureus* produtoras de toxina ao invés apenas da presença de qualquer cepa coagulase positiva na quantidade infectante. Uma reação de PCR pode detectar a presença de genes codificadores de SE determinando a presença ou não da possibilidade da expressão de toxinas de forma rápida, específica e mais acurada que testes imunológicos. A presença dos genes pode não necessariamente indicar a presença de enterotoxinas, mas pode revelar quais cepas são realmente perigosas no alimento (PELES et al., 2007).

A presença destes genes neste estudo indica que eles estão presentes em amostras de alimentos prontas para consumo (e peixe cru de feira) e, tendo as condições para tal, podem produzir a toxina ocasionando complicações para quem ingerir o produto. Contudo, este trabalho não tem a intenção de fazer uma análise estatística da quantidade de genes codificadores de toxina em circulação ou quais os subtipos encontrados, tem apenas a intenção de alertar que *S. aureus* encontrados em alimentos comercializados ou no estágio final de produção apresentavam a capacidade de produzir alguma enterotoxina, e trazer para debate se a legislação brasileira de segurança alimentar abrange esta questão.

A RDC 12 estabelece: “A enumeração de estafilococos coagulase positiva tem por objetivo substituir a determinação de *Staphylococcus aureus*. A determinação da capacidade de produção de termonuclease e quando necessário, a de toxina estafilocócica das cepas isoladas podem ser realizadas a fim de se obter dados de interesse à saúde pública.”, porém a tolerância da quantidade de microrganismos do gênero *Staphylococcus* coagulase positivos para muitos alimentos é alta. O limite máximo representado por M (onde “M é o limite que, em plano de duas classes, separa o produto aceitável do inaceitável. Em um plano de três classes, M separa o lote com qualidade intermediária aceitável do lote inaceitável. Valores acima de M são inaceitáveis”) varia desde o mais baixo, 5×10^5 (gema, clara ou suas misturas pasteurizadas, resfriadas ou congeladas e produtos a base de soja com exceção de tofu) ao

mais alto, 5×10^3 (Anexo I). O valor máximo permitido de 5×10^3 é determinado para massas alimentícias secas (com ou sem ovos, com ou sem recheio), massas alimentícias frescas, cruas e não fermentadas (com ou sem ovos, com ou sem recheio e cobertura) e similares refrigeradas; sanduíches frios e similares, pães (doce e salgado) com recheio e/ou com cobertura e similares; pães, pizzas e outras massas parcialmente preparadas (condimentadas ou não), incluindo os pães de queijo; pratos prontos para consumo a base de carnes, pescados e similares crus; tofu e similares (ANVISA, 2001).

Realmente, pequenas quantidades de toxinas já foram encontradas em casos de surtos e, cada vez mais, parece se precisar de uma concentração menor do que se imaginava para causar gastroenterites. Essa quantidade de indivíduos do gênero *Staphylococcus* coagulase positivos pode estar amplamente propícia a tal produção. Por outro lado, sua presença é quase inócua nessas quantidades se não forem produtores de enterotoxina. Sendo assim, a pesquisa de sua capacidade de produção de enterotoxina através da presença dos genes codificadores acrescenta a essa informação tornando-a mais concreta.

Este é o caso da discussão feita nos últimos tempos pelo FDA citada aqui neste trabalho. Além de abordar a discussão do órgão, BENNETT e LANCETTE (2001) também afirmam que “pequenas populações de estafilococos na hora da análise podem remanescer de grandes populações que produzem enterotoxina em quantidade suficiente para causar toxinfecção” e apontam a falta de testes para diferenciar a presença ou não de toxinas.

Mesmo sendo a SEA a enterotoxina mais comum como causa de gastroenterites (PANNEERSEELAN e MURIANA, 2009), DERZELLE et al. (2009) concluíram em seu estudo que SEB e SEC podem ser expressas em quantidades muito maiores que outras enterotoxinas. Enquanto SEA, SED e SEE eram expressas em menos de 8 mg/ml, SEB e

SEC chegavam a 100 mg/ml. Isto mostra que o problema pode ser ainda maior que o relatado aqui já que apenas mostramos a presença de gene codificador de SEA.

Outro fato relevante para a discussão sobre a melhor maneira de fiscalizar os produtos alimentícios com potencial para causar gastroenterite é que os genes codificadores de toxina ficam em sua maioria posicionados em elementos móveis do genoma como muitos genes de fatores de virulência (DERZELLE et al., 2009). Devido a isto nem sempre eles estão dentro da bactéria em si, mas podem estar se movendo de um microrganismo a outro mostrando, mais uma vez, a necessidade de monitoramento do próprio gene do que do microrganismo em si.

Neste trabalho, apenas uma das amostras apresentou ambos os genes, o de codificação da SEA e o *mecA*, é uma amostra pequena sem pretensão estatística, porém SILVA et al. (2009) afirmam que em um estudo feito com MRSA o gene de enterotoxina mais encontrado foi o *seg* e *sei* (das enterotoxinas SEG e SEI) com 49% dos MRSA pesquisados enquanto o *sea* foi encontrado em apenas 12%. Ou seja, outras toxinas podem estar associadas com genes de resistência em outras cepas sem que pudéssemos visualizar. Tal cepa com ambos os genes é proveniente de uma amostra de “bentô”. Isso pode ser novamente um indicativo do papel da manipulação, já que é um produto que envolve este aspecto. Todavia, esta cepa é um importante representante do risco da disseminação de ambos os problemas (enterotoxina e resistência) em um único microrganismo.

De qualquer modo, os dois genes representantes das duas questões que podem estar envolvidas na via alimentar foram de fato encontrados em alimentos prontos para consumo e peixe cru por nós, levantando um debate sobre estes dois pontos problemáticos.

6 CONCLUSÃO

Em conclusão, esta pesquisa confirma que as questões que se procurou levantar são de fato relevantes para a saúde pública e merecem maior atenção. A presença do gene de enterotoxina em produtos prontos para consumo e peixe cru é um fato e pode ser bem mais extenso que o apontado, uma vez que as amostras aqui presentes foram de fontes limitadas e apenas um subtipo de enterotoxina foi testado. O debate sobre qual a melhor forma da vigilância sanitária alimentar determinar a segurança ou não de um alimento quanto à presença de *Staphylococcus aureus* deve ser mantido e melhor avaliado.

Já no caso do gene de resistência, evidenciou-se que ele pode realmente ser encontrado em alimentos prontos para consumo (e peixe cru) e que, portanto, pode se disseminar por esta via, usualmente pouco pesquisada. É a primeira vez que se demonstra a presença do gene *mecA* em alimentos prontos para consumo no Brasil e América Latina pelo que se pôde constatar na literatura. Isto não necessariamente significa uma baixa frequência de MRSA em alimentos no país, já que a epidemiologia deste tipo de patógeno resistente ainda é pouco estudada nesta via de transmissão.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANVISA. Resolução-RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 10 de janeiro de 2001

Araújo RS, Carvalho RTT, Matté GR, Fernandes LN, Balsalobre LC, Matté MH. Modified method for detection of *Cryptosporidium* oocysts using DNA templates extracted from environmental samples. REVISA. Revista Brasileira de Vigilância Sanitária .2006;3: 3-4.

Bächi-Berger B. Resistance to beta-Lactam Antibiotics: Resistance Not-Mediated By Beta-Lactamase (Methicillin Resistance). In: Crossley KB, Archer GL, editores. The Staphylococci in human disease. EUA: Churchill Livingstone; 1997. p 158-166.

Bennett RW, Lancette GA. *Staphylococcus aureus*. U.S. Food and Drug Administration, Bacteriological analytical manual online, Chapter 12 [periódico na internet]. 2001/jan [Acesso em: 5 de fevereiro de 2010]; Disponível em: <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm071429.htm>

Blaiotta G, Ercolini D, Pennacchia C, Fusco V, Casaburi A, Pepe O, Villani F. PCR detection of Staphylococcal enterotoxin genes in *Staphylococcus spp* strains isolated from meat and dairy products. Evidence of new variants of seG and seI in *Staphylococcus aureus* AB-8802. J Appl Microbiol. 2004;97:719-730.

Bohach GA, Dinges MM, Mitchell DT, Ohlendorf DH, Schlievert PM. Exotoxins. In: Crossley KB, Archer GL, editores. The Staphylococci in human disease. EUA: Churchill Livingstone, 1997. p 83.

Brantl S. Bacterial gene regulation: from transcription attenuation to riboswitches and ribozymes. Trends Microbiol. 2004;12(11):473-475.

Cha J, Vakulenko SB, Mobashery S. Characterization of the β -lactam antibiotic sensor domain of the MecR1 signal sensor/transducer protein from Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. Biochemistry. 2007;46:7822-7831.

Chambers HFMD. Antibióticos beta-lactâmicos e Outros inibidores da síntese de parede celular: compostos beta-lactâmicos. In: Katzung BG, editor. Farmacologia: Básica e Clínica. Rio de Janeiro, Brasil: Guanabara Koogan; 2003. p 656.

Chongtrakool P, Ito T, Xue Ma X, Kondo Y, Trakulsomboon S, Tiensasitorn C, Jamklang M, Chavalit T, Song J, Hiramatsu K. Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* (SCC*mec*) Typing of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains Isolated in 11 Asian Countries: a Proposal for a New Nomenclature for SCC*mec* Elements. Antimicrob Agents Chemother. 2006;50(3): 1001-1012.

Cimolai N. MRSA and the environment: implications for comprehensive control measures. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2008;27:481-493.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2008. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Eighteenth informational supplement. M100-S18.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2003. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved standard M2-A8; Eighth Edition. CLSI, Wayne, PA.

Del'Alamo L, d'Azevedo PA, Strob AJ, Rodríguez-Lopez DV, Monteiro J, Andrade SS, Pignatari AC, Gales AC. An outbreak of catalase-negative methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Hosp Infect. 2007;65:226-230.

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

Deutscher MP. Degradation of RNA in bacteria: comparison of mRNA and stable RNA. Nucleic Acids Res. 2006;34(2):659-666.

Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. Clin. Microbiol Rev. 2000;13(1):16-34.

Fagundes H, Oliveira CAF. Infecções intramamárias causadas por *Staphylococcus aureus* e suas implicações em Saúde Pública. Cienc Rural. 2004;34(4):1315-1320.

Fortes CQ, Espanha CA, Bustorff FP, Zappa BC, Ferreira AL, Moreira RB, Pereira NG, Fowler VG Jr, Deshmukh H. First reported case of infective endocarditis caused by community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* not associated with healthcare contact in Brazil. Braz J Infect Dis. 2008;12(6):541-543.

Fuda C, Suvorov M, Vakulenko SB, Mobashery S. The basis for resistance to beta-lactam antibiotics by penicillin-binding protein 2a of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Biol Chem. 2004;279(39):40802-40806.

García-Castellanos R, Marrero A, Mallorquí-Fernández G, Potempa J, Coll M, Gomis-Ruth FX. Three-dimensional structure of MecI: Molecular basis for transcriptional regulation of staphylococcal methicillin resistance. J Biol Chem. 2003;278(41):39897-39905.

García-Castellanos R, Mallorquí-Fernández G, Marrero A, Potempa J, Coll M, Gomis-Ruth FX. On the transcriptional regulation of methicillin resistance: MecI repressor in complex with its operator. J Biol Chem. 2004;279(17):17888-17896.

Germano MIS. Treinamento de Manipuladores de Alimentos: fator de segurança alimentar e promoção da saúde. São Paulo: Varela; 2003.

Germano PML, Germano MIS. Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos. São Paulo: Manole; 2007.

Gollnick P, Babitzke P. Transcription attenuation. Biochim Biophys Acta. 2002;240-250.

Goudreau PN, Stock AM. Signal transduction in bacteria: molecular mechanisms of stimulus-response coupling. Curr Opin Microbiol. 1998;1(2):160-169.

- Hanssen AM, Sollid JUE. SCCmec in staphylococci: genes on the move. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2005;46:8-20.
- Harbarth S, Samore MH. Interventions to control MRSA: high time for time-series analysis? *J Antimicrob Chemother*. 2008;62:431-433.
- Hiramatsu, K. Molecular Evolution of MRSA. *Microbiol Immunol*. 1995;39(8):531-543.
- Hou Z, Meng JR, Niu C, Wang HF, Liu J, Hu BQ, Jia M, Luo XX. Restoration of antibiotic susceptibility in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by targeting *mecR1* with a phosphorothioate deoxyribozyme. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2007;34:1160-1164.
- Ito T, Katayama Y, Asada K, Mori N, Tsutsumimoto K, Tiensasitorn C, Hiramatsu K. Structural comparison of three types of Staphylococcal cassette chromosome *mec* integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001;45:1323-1336.
- Jones TF, Kellum ME, Porter SS, Bell M, Shaffner W. An Outbreak of Community-Acquired Foodborne Illness Caused by Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Emerg Infect Dis*. 2002; 8(1): 82-84.
- Karahan M, Açık MN, Cetinkaya B. Investigation of toxin genes by polymerase chain reaction in *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis in Turkey. *Foodborne Pathog Dis*. 2009;6(8):1029-1035.
- Kérouanton A, Hennekinne JA, Letertre C, Petit L, Chesneau O, Brisabois A, Buyser ML. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains associated with food poisoning outbreaks in France. *Int J Food Microbiol*. 2006;115(3):369-375.
- Kitai S, Shimizu A, Kawano J, Sato E, Nakano C, Uji T, Kitawaga H. Characterization of methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolated from retail Chicken Meat in Japan. *J Vet Med Sci*. 2004;67(1):107-110.
- Klevens RM, Morrison MA, Nadle J, Petit S, Gershman K, Ray S, Harrison LH, Lynfield R, Dumyati G, Townes JM, Craig AS, Zell ER, Fosheim GE, McDougal LK, Carey RB, Fridkin SK. Invasive Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections in the United States. *J Am Med Assoc*. 2007;298(15):1763-1771.
- Kluytmans J, van Leeuwen W, Goessens W, Hollis R, Messer S, Herwaldt L, Bruining H, Heck M, Rost J, van Leeuwen N. Food-initiated outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* analyzed by pheno- and genotyping. *J Clin Microbiol*. 1995;33(5):1121-1128.
- Kluytmans JA. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in food products: cause for concern or case for complacency? *Clin Microbiol Infect*. 2010;16(1):11-15.
- Kong RYC, Dung WF, Vrijmoed LPP, Wu RSS. Co-detection of three species of water-borne bacteria by multiplex PCR. *Mar Pollut Bull*. 1995;31:317-324.
- Lee JH. Methicillin (Oxacillin)- Resistant *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Major Food Animals and Their Potencial Transmition to Humans. *Appl Environ Microbiol*. 2003;69:6489-6494.

Lee JH. Occurrence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from cattle and chicken, and analyses of their *mecA*, *mecR1* and *mecI* genes. *Vet Microbiol.* 2006;114:155-159.

Letertre C, Perelle S, Dilasser F, Fach P. Detection and Genotyping by real-time PCR of staphylococcal enterotoxin genes *sea* to *sej*. *Mol Cell Probes.* 2003;17:139-147.

Li X, Mehrotra M, Ghimire S, Adewoye L. β -Lactam resistance and β -lactamases in bacteria of animal origin. *Vet Microbiol.* 2007;121:197-214.

Lipsitch M, Samore MH. Antimicrobial use and antimicrobial resistance: a population perspective. *Emerg Infect Dis.* 2002;8(4):347-354.

Lovseth A, Loncarevic S, Berdal KG. Modified multiplex PCR method for detection of pyrogenic exotoxin genes in Staphylococcal isolates. *J Clin Microbiol.* 2004;42(8):3869-3872.

Mason WJ, Blevins JS, Beenken K, Wibowo N, Ojha N, Smeltzer MS. Multiplex PCR protocol for the diagnosis of staphylococcal infection. *J Clin Microbiol.* 2001;39(9):3332-3338.

Mattos EC. Caracterização genotípica de cepas de *Staphylococcus aureus* recuperadas de alimentos, mãos de manipuladores de alimentos e veiculadas por formigas [dissertação de mestrado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP; 2005.

McCallum N, Berger-Bächi B, Senn MM. Regulation of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. *Int J Med Microbiol.* 2010;300(2-3):118-129.

McMahon MA, Xu J, Moore JE, Blair IS, McDowell DA. Environmental Stress and Antibiotic Resistance in Food-Related Pathogens. *Appl Environ Microbiol.* 2006;73(1):211-217.

Mohanasounddaram KM, Lalitha MK. Comparison of phenotypic versus genotypic methods in the detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Indian J Med Res.* 2008;127:78-84.

Montanari MP, Massidda O, Mingoia M, Varaldo PE. Borderline Susceptibility to Methicillin in *Staphylococcus aureus*: A New Mechanism of Resistance? *Microb Drug Resist.* 1996;2(2):257-260.

Nadarajah J, Lee MJ, Louie L, Jacob L, Simor AE, Louie M, McGavin MJ. Identification of different clonal complexes and diverse amino acid substitutions in penicillin-binding protein 2 (PBP2) associated with borderline oxacillin resistance in Canadian *Staphylococcus aureus* isolates. *J Med Microbiol.* 2006;55(12):1675-1683.

Normanno G, La Salandra G, Dambrosio A, Quaglia NC, Corrente M, Parisi A, Santagada G, Firinu A, Crisetti E, Celano GV. Occurrence, characterization and antimicrobial resistance of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from meat and dairy products. *Int J Food Microbiol.* 2007a;115(3):290-296.

Normanno G, Corrente M, La Salandra G, Dambrosio A, Quaglia NC, Parisi A, Greco G, Bellacicco AL, Virgilio S, Celano GV. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in foods of animal origin product in Italy. *Int J Food Microbiol.* 2007b;117:219-222.

- Novak FR, Almeida JA, Warnken MB, Ferreira-Carvalho BT, Hagler AN. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in human milk. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2000;95(1):29-33.
- Okuma K, Iwakawa K, Turnidge JD, Grubb WB, Bell JM, O'Brien FG, Coombs GW, Pearman JW, Tenover FC, Kapi M, Tiensasitorn C, Ito T, Hiramatsu K. Dissemination of New Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Clones in the Community. J Clin Microbiol. 2002;40(11):4289-4294.
- Panneerseelan L, Muriana PM. An immunomagnetic PCR signal amplification assay for sensitive detection of *Staphylococcus aureus* enterotoxins in foods. J Food Prot. 2009; 72(12):2538–2546.
- Parker MT, Lapage SP. Penicillinase production by *Staphylococcus aureus* strains from outbreaks of food poisoning. J Clin Pathol. 1957;10(4):313-317.
- Peles F, Wagner M, Varga L, Hein I, Rieck P, Gutser K, Keresztúri P, Kardos G, Turcsányi I, Béri B, Szabó A. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine milk in Hungary. Int J Food Microbiol. 2007;118(2):186-193.
- Rajkovic A, El Moulaj B, Uyttendaele M, Brolet P, Zorzi W, Heinen E, Foubert E, Debevere J. Immunoquantitative Real-Time PCR for Detection and Quantification of *Staphylococcus aureus* Enterotoxin B in Foods. Appl Environ Microbiol. 2006; 72(10): 6593–6599.
- Rang HP, Dale MM, Ritter JM. Farmacologia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001.
- Reinert C, McCulloch JA, Watanabe S, Ito T, Hiramatsu K, Mamizuka EM. Type IV SCCmec found in decade old Brazilian MRSA isolates. Braz J Infect Dis. 2008;12(3):213-216.
- Ribeiro A, Dias C, Silva-Carvalho MC, Berquó L, Ferreira FA, Santos RN, Ferreira-Carvalho BT, Figueiredo AM. First report of infection with community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in South America. J Clin Microbiol. 2005;43(4):1985-1988.
- Rozenbaum R, Sampaio MG, Batista GS, Garibaldi AM, Terra GM, Souza MJ, Vieira EN, Silva-Carvalho MC, Teixeira LA, Figueiredo AM. The first report in Brazil of severe infection caused by community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA). Braz J Med Biol Res. 2009;42:756-760.
- Sakoulas G, Moise-Broder PA, Schentag J, Forrest A, Moellering RC Jr, Eliopoulos GM. Relationship of MIC and bactericidal activity to efficacy of vancomycin for treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. J Clin Microbiol. 2004;42(6):2398-2402.
- Schneider-Lindner V, Delaney JÁ, Dial S, Dascal A, Suissa S. Antimicrobial Drugs and Community-acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*, United Kingdom. Emerg Infect Dis. 2007;3(7): 994-1000.
- Sila J, Sauer P, Kolar M. Comparison of the prevalence of genes coding for enterotoxins, exfoliatins, panton-valentine leukocidin and tsst-1 between methicillin-resistant and methicillin-susceptible isolates of *Staphylococcus aureus* at the university hospital in

olomouc. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub. 2009;153(3):215-218.

Sousa-Junior FC, Silva-Carvalho MC, Fernandes MJ, Vieira MF, Pellegrino FL, Figueiredo AM, Melo MC, Milan EP. Genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates obtained in the Northeast region of Brazil. Braz J Med Biol Res. 2009;42(10):877-881.

Wilkison BJ. Biology: Phylogeny and Taxonomy of Staphylococci. In: Crossley KB, Archer GL, editores. The Staphylococci in human disease. EUA: Churchill Livingstone; 1997.

Weller TM. The distribution of *mecA*, *mecR1* and *mecI* and sequence analysis of *mecI* and the *mec* promoter region in staphylococci expressing resistance to methicillin. J Antimicrob Chemother. 1999;43(1):15-22.

Yamamoto T, Nishiyama A, Takano T, Yabe S, Higuchi W, Razvina O, Shi D. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: community transmission, pathogenesis, and drug resistance. J Infect Chemother. 2010 Mar 25; [Epub ahead of print].

ANEXOS

Anexo 1. Limite máximo (M) de estafilococos coagulase positiva para cada tipo alimentar segundo a RDC 12, ANVISA.

Tipo alimentar	Limite máximo (M)
Gema, clara ou suas misturas, pasteurizadas, resfriadas ou congeladas, com ou sem açúcar, sal e outros aditivos	5×10^1
Demais casos de ovos e derivados	5×10^2
Hortaliças, legumes e similares, incluindo cogumelos (fungos comestíveis); raízes, tubérculos e similares	10^3
Demais produtos vegetais	5×10^2
Produtos cárneos crus, refrigerados ou congelados	5×10^3
Carnes embaladas a vácuo, produtos cárneos cozidos ou não, embutidos ou não; produtos a base de sangue e derivados, processados; gorduras e produtos gordurosos de origem animal	3×10^3
Semi conservas em embalagens herméticas mantidas sob refrigeração	5×10^2
Produtos cárneos salgados	10^3
Pescados e produtos de pesca	5×10^2 a 10^3
Leite de bovinos ou outros mamíferos e derivados	10^2 a 10^3
Farinhas, massas alimentícias, produtos para panificação e similares	5×10^2 a 10^3
Massas alimentícias frescas, cruas e não fermentadas (com ou sem ovos, com ou sem recheio e cobertura) e similares refrigeradas; sanduíches frios e similares	5×10^3
Pães, pizzas e outras massas parcialmente preparadas (condimentadas ou não), incluindo os pães de queijo	5×10^3
Pratos prontos para consumo a base de carnes, pescados e similares crus	5×10^3
Tofu e similares	5×10^3
Especiarias temperos, condimentos e molhos preparados e similares	10^2
Margarina, azeite virgem, gorduras e cremes vegetais e similares	
Chocolates, balas, produtos para Confeitar, Gomas de mascar e similares	5×10^2 a 10^3
Gelados comestíveis e produtos para o preparo de gelados comestíveis	5×10^2
Produtos a base de soja (exceto tofu)	5×10 a 10^2
Leite de coco e coco ralado	5×10^2 a 10^3

Fonte: ANVISA, 2001

GLOSSÁRIO

Amplicon: Fragmento resultando da amplificação em uma reação de PCR

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

Bentô: Prato combinado japonês, tradicionalmente é feito de arroz, peixe ou carne e legumes cozidos ou em conserva

Beta-lactamase: Enzima que quebra o anel beta-lactâmico de antibióticos

Beta-lactâmicos: Antimicrobianos que possuem uma estrutura principal com um anel tiazolidínico, fixado ao anel beta-lactâmico. Essas drogas interferem na ligação cruzada de transpeptidação da parede celular

BLAST: “*Basic Local Alignment and Search Tool*”, Ferramenta de consulta e alinhamento de sequências gênicas

CLSI: “*Clinical and Laboratory Standards Institute*”, Instituto que estabelece padrões de procedimentos clínicos

C-MRSA: *methicillin-resistant Staphylococcus aureus* de surtos de origem comunitária

Complexo bla: Conjunto dos genes codificadores e reguladores da produção de beta-lactamase: *blaZ*, *blaI* e *blaR1*

Complexo ccr: região gênica utilizada na identificação dos tipos de SCCmec

Complexo mec: Conjunto dos genes codificadores e reguladores da produção de PBR2a: *mecA*, *mecI* e *mecR1*

DNA: Ácido desoxirribonucleico (ADN em português ou, em inglês, DNA: *deoxyribonucleic acid*)

DNTP: Desoxirribonucleotídeos Fosfatados, são os quatro nucleotídeos do DNA (Adenina, Citosina, Guanina e Timina)

ETs: Toxinas esfoliativas

FDA: “*Food and Drug Administration*”, órgão responsável pela segurança alimentar nos EUA

Fingerprint: Padrão de bandas que caracterizam cepas diferentes ou clones em um perfil genotípico

H-MRSA: *methicillin-resistant Staphylococcus aureus* de surtos de origem hospitalar

mecA: Gene codificador da proteína PBP2a que confere resistência à penicilinas semi-sintéticas

mecI: Gene codificador de proteína reguladora do gene *mecA*

mecR1: Gene codificador de proteína sinalizadora de transcrição do gene *mecA*

Meticilina: penicilina semi-sintética resistente a ação da enzima beta-lactamase

MLST: “*Multi Locus Sequence Typing*”, processo de formação de perfil de bandas para tipagem genotípica

MRSA: “*methicillin-resistant Staphylococcus aureus*”, *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (ou qualquer penicilina semi-sintética correspondente)

MSSA: “*methicillin-susceptible Staphylococcus aureus*”, ou seja, suscetíveis à meticilina

NORSA: “*non-multiresistant oxacillin-resistant S. aureus*”, *Staphylococcus aureus* não resistentes à meticilina/oxacilina

ORF: “*open reading frames*”, uma região de sequência repetitiva de inserção de elementos gênicos

Oxacilina: penicilina semi-sintética resistente a ação da enzima beta-lactamase correspondente a meticilina no Brasil.

pb: “pares de base”, medida para tamanhos de fragmentos de DNA pela quantidade de pares de bases nitrogenadas que possui

PBP: “*penicillin-binding protein*”, proteínas que catalisam a transpeptidação da parede celular

PBP2a: PBP codificada pelo gene *mecA* que possui baixa afinidade com antimicrobianos beta-lactâmicos originando resistência à droga

PCR: “*Polymerase Chain Reaction*”, ou reação em cadeia da polimerase, é um método de amplificação (de criação de múltiplas cópias) de DNA

PCR real time: reação em cadeia da polimerase com visualização das amplificações em tempo real através da visualização de gráficos formados em um computador

Pellet: Concentrado de restos sólidos sedimentados após centrifugação

Pré-MRSA: “*methicillin-resistant Staphylococcus aureus*” ainda inativos por forte repressão dos genes reguladores

PTAgS: Superantígenos tóxicos pirogênicos

RDC: Resolução da Diretoria Colegiada

rDNA: DNA (ácido desoxirribonucléico) ribossomal

Região 16S: Região conservada do DNA (ácido desoxirribonucléico) utilizada para diferenciação molecular de espécies ou gêneros

RNase: Enzima que degrada RNA

Sashimi: Peixes e frutos do mar muito frescos, fatiados em pequenos pedaços e servidos crus

SCCmec: complexo móvel do cromossomo conhecido (*staphylococcal cassette chromosome mec*)

SE: Enterotoxinas estafilocócicas

SEA: Enterotoxina estafilocócica do subtipo A

sea: Gene codificador da proteína SEA

Sushi: Arroz temperado com molho de vinagre combinado com algum tipo de peixe, frutos do mar ou vegetais

TSST-1: Toxina responsável pela síndrome do choque tóxico

Virulência: Capacidade que um patógeno possui em causar dano

Currículo Lattes (primeira página) da aluna **Camila Fonseca Rizek**

(De acordo com a Portaria CPG/03/08 de 05/06/08)

Camila Fonseca Rizek

Bolsista de Mestrado do CNPq

Bióloga graduada pela Universidade Federal de São Carlos (2006) e mestranda em serviço de saúde pública pela Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo (FSP-USP).

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/4136374214958221>

Dados pessoais

Nome Camila Fonseca Rizek

Nome em citações bibliográficas RIZEK, C. F.

Sexo Feminino

Formação acadêmica/Titulação

2002 - 2006 Graduação em Ciências Biológicas .
Universidade Federal de São Carlos, UFSCAR, Brasil.
Título: EFEITO DA APLICAÇÃO TÓPICA REPETIDA DE TINTURA CAPILAR
SOBRE A INTENSIDADE DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL EM
CAMUNDONGOS..
Orientador: Prof. Dr. Fábio Gonçalves Pinto.

Formação complementar

- 2009 - 2009 Gerenciamento de Resíduos Analíticos (CONAMA 358). (Carga horária: 2h).
AMBICAMP- Coleta e destinação de resíduos Ltda.
- 2008 - 2008 II Oficina de Escrita Científica. (Carga horária: 32h). Faculdade de Saúde Pública da
Universidade de São Paulo.
- 2008 - 2008 Novos Padrões de Resistência. (Carga horária: 4h). Sociedade Brasileira de
Microbiologia.
- 2007 - 2007 Instrumentos de Gestão da Qualidade dos Alimentos. (Carga horária: 60h).
Faculdade de Saúde Pública - USP.
- 2007 - 2007 Sist. de Qualidade Laboratorial e Proced/os Admin.. (Carga horária: 3h). Faculdade
de Saúde Pública - USP.
- 2007 - 2007 Biossegurança e descartes de produtos químicos. (Carga horária: 8h). Faculdade de
Ciências Farmacêuticas - USP.
- 2004 - 2004 Novas pesquisas aplicadas no tratamento do câncer. (Carga horária: 4h).
Universidade Federal de São Carlos, UFSCar, Brasil.
- 2004 - 2004 Microbiologia aplicada ao tratamento de águas. (Carga horária: 8h). Universidade
Federal de São Carlos, UFSCar, Brasil.

Atuação profissional

Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, FSP-USP, Brasil.

Vínculo institucional :Vínculo: Mestrando, Carga horária: 40, Regime: Dedicção exclusiva.

2008 - Atual Atividades de Participação em Projeto, Faculdade de Saúde Pública
Projetos de pesquisa: PESQUISA DE GENES DE RESISTÊNCIA E
ENTEROTOXINA EM CEPAS DE *Staphylococcus aureus* PRESENTES EM
AMOSTRAS DE ALIMENTOS PRONTOS PARA CONSUMO.

Currículo Lattes (primeira página) do orientador **Prof. Dr. Pedro Manuel Leal Germano**

(De acordo com a Portaria CPG/03/08 de 05/06/08)

Pedro Manuel Leal Germano

Prof Dr. Pedro Manuel Leal Germano Português, natural de Lisboa, com igualdade de direitos, de acordo com a Convenção sobre Estatuto da Igualdade, Expedida conforme Decreto Federal 70.436, de 13.4.72. Médico Veterinário graduado pela Faculdade Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP), em 1969. Sanitarista, Mestre e Doutor em Saúde Pública pela Faculdade de Saúde Pública (FSP) da USP, no período de 1972 a 1981. Pós Doutorado no Departamento de Microbiologia do Instituto Pasteur de Paris, França, em 1984. Professor Livre Docente, 1996, e Adjunto (1998) pela FMVZ da USP. Professor Titular pela FSP da USP, desde 1993. Chefe do Departamento de Prática de Saúde Pública da FSP da USP, nas gestões de 1996, 1998 e 2002. Chefe Suplente nas gestões de 2000 e 2006. Coordenador do Curso de Especialização em Vigilância Sanitária de Alimentos da FSP da USP, desde 1998. Membro da Câmara Técnica de Alimentos da Gerência Geral de Alimentos da Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA, do Ministério da Saúde, desde 02.2004. Co-autor com Maria Izabel Simões Germano, doutora pela FSP da USP, do Livro de Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos, da editora Manole, em 3ª edição, e de capítulos sobre Alimentos e suas Relações com a Educação Ambiental, no Livro de Educação Ambiental e Sustentabilidade, da Editora Manole, e sobre Vigilância Sanitária, no Livro de Gestão de Serviços da Saúde, da Editora EDUSP; co-autor com Gillian Alonso Arruda, doutora pela FSP da USP e Maria Helena Matté e Carlos Jorge Rocha Oliveira, do livro Listeria e Listeriose: perigo para as gestantes, da editora Ponto Crítico. Professor dos Cursos de Pós-Graduação da FSP da USP e responsável pelas disciplinas de Princípios de Vigilância Sanitária, de Instrumentos para a Gestão de Qualidade dos Alimentos e de Segurança Alimentar: Projetos de Capacitação de Pessoal. Professor convidado da FMVZ da USP e do Centro Universitário São Camilo.

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/8111077925320682>

Dados pessoais

Nome Pedro Manuel Leal Germano
Nome em citações bibliográficas GERMANO, Pedro Manuel Leal
Sexo Masculino

Endereço profissional Universidade de São Paulo. Av. Dr. Arnaldo, 715 Cerqueira Cezar
01246-904 - Sao Paulo, SP - Brasil
Telefone: (11) 30667767 Fax: (11) 30833501

Formação acadêmica/Titulação

1987 Livre-docência.

Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

Título: Estudo da etiopatogenia da raiva: avaliação de três cepas de vírus rábico antigenicamente distintas, em camundongos., *Ano de obtenção:* 1987.

Palavras-chave: Veterinaria; Saude Publica; Raiva; Cepas rábicas; Raiva, cepas antigênicas.

Grande área: Ciências Biológicas / *Área:* Imunologia.

Grande área: Ciências da Saúde / *Área:* Saúde Coletiva.

1984 - 1985 Pós-Doutorado. Institute Pasteur de Paris.

Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, Brasil.

Grande área: Ciências Biológicas / *Área:* Imunologia / *Subárea:* Imunologia Aplicada.

1974 – 1976 Mestrado em Saúde Pública (Conceito CAPES 5). Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

Título: Estudo comparativo entre as técnicas de coloração de Sellers, imunofluorescência direta e inoculação em camundongos aplicadas ao diagnóstico laboratorial da raiva canina., *Ano de Obtenção:* 1976.

Orientador: Omar Miguel.

Palavras-chave: Diagnostico da Raiva; Raiva; Raiva Canina.

Grande área: Ciências da Saúde / *Área:* Saúde Coletiva / *Subárea:* Saúde Pública.