UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

Caracterização genotípica dos fatores de virulência e seu
regulador *agr* em cepas de *Staphylococcus aureus*
sensíveis à oxacilina

Marco Aurélio Vianello

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof. Dra. Elsa Massae Mamizuka

São Paulo
2006

Marco Aurélio Vianello

Caracterização genotípica dos fatores de virulência e seu
regulador *agr* em cepas de *Staphylococcus aureus*
sensíveis à oxacilina

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Elsa Massae Mamizuka
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

São Paulo, _____ de _____.

Agradecimentos Especiais

Deus

Em vossa sabedoria, regozijo-me.

Meus Pais

*A simplicidade enraizada em suas vidas, a árdua necessidade do pesado trabalho tão pouco remunerado e o cansaço físico de cada findar de vossas jornadas apenas solidificavam o amor demonstrado para com seus filhos. De suas simples atitudes nós, filhos, observávamos a grandeza de vossas sabedorias. Neste momento compreendo, meus amados pais, como fostes tão grandes e sábios quando, mesmo desprovidos da intelectualidade dos bancos escolares, porém agraciados com o bom saber da vida, mostraram-me a necessidade de sempre se buscar, não somente a formação acadêmica, como também o aprimoramento profissional. São vossos ensinamentos os alicerces que sustentam cada vitória minha!
Guardo-vos sempre em meu coração!*

Minha esposa, Tullia

*Divido, contigo, minha vida, pois acredito que o amor é o somatório de um mundo
infindável de sentimentos e ações: compartilhar, sorrir, chorar, abraçar, beijar, suar
as mãos...descompassar o coração!*

*Sua presença em minha vida faz-me seguro; contigo acredito que o vencer é real;
em ti busco a paz...sem você perco o Norte...és, sem dúvidas, a estrela-guia de
minha vida!*

A toda minha família

*A vocês todos (inclusive os cunhados!!!) meu muito obrigado. Saber que encontro-
me, em qualquer momento, amparado por vocês, oferece-me a estabilidade
indispensável em minha jornada!*

Professora Elza:

Apoiei-me em vossos conhecimentos,

Enriqueci-me com vossos conselhos,

Cresci com vossas críticas...

E alegrei-me com vossa amizade!

Obrigado por aceitar-me em vosso convívio!

Amigos e colegas

Percebi a dificuldade de conciliar meu trabalho externo com a pós-graduação!

Tenho certeza que, se me encontro nesta etapa final, foi devido a vossa ajuda física, intelectual e incentivadora! Espero que consiga transmiti-los a intensidade e grandiosidade desta palavra : Obrigado!

AGRADECIMENTOS

Aos grandes amigos John Anthony McCulloch e Nilton Lincopan por toda ajuda prestada, pelo excelente convívio e pelas cervejas compartilhadas!

Aos colegas de laboratório Ana Carolina, Juliana, Carla, José Antônio, Diogo e Cristina pelo companheirismo e pela convivência harmoniosa.

À professora Anna Sara Levin, do Laboratório de Investigação Clínica da Faculdade de Medicina da USP, pela ajuda e pelo empréstimo de seu laboratório para a conclusão prática de meu trabalho.

À Priscila Arruda Trindade, pela ajuda profissional e amiga para a realização da eletroforese de campo pulsado (PGFE)

Ao colega Robson, técnico, do Laboratório de Investigação Clínica da Faculdade de Medicina da USP, pela ajuda dispensada.

À professora Marina Baquerizo Martinez não somente por ser a “patrocinadora” de minhas especializações, como também de mostrar-me sempre presente e amiga.

Aos estagiários do laboratório Ana Paula e Renato pela ajuda dispensada.

Aos amigos do LAC, HGeSP, pelo convívio harmonioso e camarada.

Abreviaturas

APC – Célula Apresentadora de Antígeno

agr – Regulador de genes acessórios

bp – Pares de bases

cna – Fator de ligação ao Colágeno

eta – gene codificador para toxina esfoliativa A

ETA – Toxina Esfoliativa A

etb - gene codificador para toxina esfoliativa B

ETB – Toxina Esfoliativa B

HLA – Alfa-Hemolisina

hla – Gene codificador da alfa-hemolisina

HLB – Beta-Hemolisina

hlb – Gene codificador da beta-hemolisina

HLG –Gifa-hemolisina

hlg – Gene codificador da gama-hemolisina

KDa - Kilodalton

lukE-lukD – Gene codificador para leucocidina E-D

lukE-lukD –Leucocidina E-D

MHC – Complexo principal de histocompatibilidade

NCCLS - “National Comitee for Clinical Laboratory Standards”

MODS - Síndrome de Disfunção de Múltiplos Órgãos

ORF's – *Open Reading Frames*

ORSA – Staphylococcus aureus resistente à Oxacilina

PCR – Reação em cadeia da Polimerase

PFGE – Pulsed Field Gel eletrophoresis

PTs - Toxinas Pirogênicas

pvl – Gene codificador para Leucocidina de Panton-Valentine

PVL –Leucocidina de Panton-Valentine

PTSAgs – Toxinas Pirogênicas com Atividade de Superantígenos

SAGs - Superantígenos

sea* – *see – Genes codificadores para enterotoxinas A- E

SEA– SEE – enterotoxinas A- E

SaPIs – Ilhas de Patogenicidades

SFP – Intoxicação Alimentar Estafilocócica

SSSS – Síndrome da Pele Escaldada Estafilocócica

TCR – Receptor de Células T

TSST-1 – Toxina da Síndrome do Choque Tóxico

tst – Gene Codificador da TSST-1

UFC – Unidades Formadoras de Colônias

Sumário

1 – INTRODUÇÃO	01
1.1 – Toxinas com atividades em membranas	04
1.1.1. Hemolisinas	04
1.1.2. Toxinas Bicomponentes	07
1.2 – Toxinas com atividades de superantígenos	10
1.2.1. Enterotoxinas estafilocócicas	11
1.2.2. Toxina da Síndrome do Choque tóxico	18
1.2.3. Toxinas Esfoliativas	22
1.3. - <i>Locus agr</i>	26
 2 – OBJETIVOS	 29
2.1- Geral	29
2.2 - Específicos	29
 3 – MATERIAIS E MÉTODOS	 30
3.1- Amostras bacterianas	30
3.2 -Triagem para confirmação da sensibilidade à oxacilina	33
3.3 - Análise do polimorfismo de DNA por eletroforese de Campo	
Pulsado (PFGE)	33
3.4 - Obtenção do DNA Genômico p/ as amplificações	37

3.5 - Detecção dos genes codificadores dos fatores de virulência e o tipo de <i>agr</i> presente	37
3.5.1. Reação em cadeia da polimerase (PCR) para detecção dos genes dos principais fatores de virulência em estudo.....	37
3.5.2. determinação do perfil do polimorfismo do <i>locus agr</i>	41
3.6 – Eletroforese em gel de agarose.....	43
3.7. Determinação do tamanho dos fragmentos de DNA.amplificados.....	43
 4 – RESULTADOS	45
4.1- Triagem para verificação da sensibilidade à oxacilina.....	45
4.2 - Análise por eletroforese de Campo Pulsado (PFGE).....	45
4.3 - Determinação do tipo <i>agr</i>	47
4.4 - Determinação dos genes codificadores dos fatores de virulência.....	48
 5 - DISCUSSÃO	52
 6 – CONCLUSÕES	70
 7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73

8 – ANEXOS	87
8.1. Anexo 1: Relação dos hospitais e suas localizações.....	87
8.2. Anexo 2: Relação dos resultados obtidos de PCR para os genes analisados.....	88
8.3. Anexo 3: Meios de cultura e soluções utilizados em PFGE.....	89

Índice de tabelas

Tabela 1 - Distribuição das cepas estudadas de acordo com a procedência e fonte de isolamento.....	31
Tabela 2 - Critérios para interpretação de eletroforese de campo Pulsado (PFGE).....	36
Tabela 3 - Cepas controle-positivo para cada gene de toxina pesquisado.....	38
Tabela 4 – Iniciadores utilizados para as toxinas em estudo.....	39
Tabela 5 – Iniciadores utilizados para a classificação do locus <i>agr</i>	41
Tabela 6 - Cepas padrões utilizadas para classificação do polimorfismo do locus <i>agr</i>	43
Tabela 7 - Distribuição do tipo <i>agr</i> encontrado nos 37 isolados OSSA estudados.....	48
Tabela 8 - Fonte dos isolados em função do tipo de <i>agr</i> encontrado.....	48
Tabela 9 - Genes codificadores de toxinas em função do tipo <i>agr</i> encontrado.....	49
Tabela 10 - Frequência dos genes codificadores de toxinas.....	50
Tabela 11 - Relação dos Genes de toxinas encontrados em função da origem das cepas estudadas.....	51

Índice de figuras

Figura 1- Representação da ação da alfa-hemolisina de <i>S. aureus</i> , sobre a membrana de uma célula eucariota.....	06
Figura 2 – Representação dos genes <i>agr</i> A, C, D e B.....	42
Figura 3 - Fotografia do gel obtido da eletroforese de campo Pulsado (PGFE).....	46
Figura 4 - Fragmentos obtidos com a amplificação dos tipos de <i>agr</i> I, II e III.....	47
Figura 5 - Fragmentos obtidos com a amplificação de alguns dos fatores de virulência estudados.....	48

Resumo

A capacidade do *Staphylococcus aureus* escapar do sistema imune do hospedeiro é atribuída à existência de algumas exotoxinas, as quais são codificadas por genes acessórios. A expressão de genes codificadores de exotoxinas é controlada por reguladores, tais como o *agr* (*accessory gene regulator*), sendo identificados 4 tipos polimórficos deste regulador. Neste estudo, foram utilizadas 37 isolados de *Staphylococcus aureus*, sensíveis à oxacilina, originados de laboratórios e hospitais públicos e privados brasileiros. Utilizou-se a técnica de PCR para a amplificação dos genes codificadores dos fatores de virulência estudados e do tipo de *agr* presente em cada cepa. A técnica da eletroforese em campo pulsado (PFGE) foi utilizada para se verificar a existência clonal entre os isolados. Observou-se que o gene codificador de enterotoxina mais frequentemente isolado foi o gene *sea*, todos relacionados com o tipo III de *agr*. Observou-se, também, alguns pontos divergentes com publicações anteriores como a presença dos genes *seb* e *tst* na mesma cepa (33%), cuja relação julgava-se não ser muito freqüente, o mesmo acontecendo com os genes *tst* e *lukE-lukD*. Não se encontrou isolado portador dos genes codificadores das toxinas esfoliatinas. Segundo a técnica de PFGE, não houve relação clonal entre os isolados. Conclui-se, portanto, que as bases moleculares da patogenicidade do *S. aureus* são multi-fatoriais, dependendo não somente da presença como também da expressão de alguns genes acessórios como também do tipo de *agr* presente.

Abstract

The capacity of the *Staphylococcus aureus* to escape from the immune system of the host is conferred to the existence of some exotoxins, which are codified by accessory genes. The expression of the genes of exotoxins is controlled by regulators, such as *agr* (accessory gene regulator), being identified four different types of this regulator. In this study, it had been used 37 strains of *Staphylococcus aureus*, sensible to the oxacillin, proceeding from public and private Brazilians laboratories. It had been used the PCR technique for detection of the genes of the virulence factors and the *agr* type present in each strain. The PFGE had been used for detection of clonal relationship between the strains. Thus, it was observed that the most frequently determined gene coder of enterotoxin was *sea* (100% were related as type of *agr* III). It was observed divergent points to the studies carried through in other countries, like strains with coders genes of *seb* and *tst* (33%). This correlation, the literature judged not to be frequent, the same happening for the simultaneous presence of *tst* and *lukE-lukD*. It was not found in this study strains carrying of exfoliatin toxins. According to PFGE, there wasn't evidence of clonal relationship between the strains. It is concluded, therefore, that the molecular bases of the pathogenicity of the *S. aureus* are multifactorial, depending not only on the presence, as also of the expression of some accessory genes and the *agr* type present.

1. Introdução

Os *Staphylococcus aureus* são cocos Gram-positivos anaeróbios facultativos, imóveis, catalase e coagulase positivos. A parede celular estafilocócica é resistente a lisozima e sensível à lisostafina, a qual cliva, especificamente, as pontes de pentaglicina comuns em tal gênero (LE LOIR et al., 2003). São importantes patógenos hospitalares causadores de uma variedade de manifestações clínicas, as quais incluem septicemia, feridas sépticas, artrite séptica, osteomielite, síndrome de choque séptico pós-cirúrgico, entre outros (BOYCE et al., 1997; VICENT et al, 1995). A variação deste espectro de manifestações clínicas, em sua maioria, é dependente dos numerosos fatores de virulência que cada cepa produz (LE LOIR et al., 2003). Trata-se de um dos principais microorganismos causadores de infecções hospitalares (MELZER, 2003), contribuindo, significativamente, para a taxa de mortalidade e morbidade dos pacientes, além de serem responsáveis por doenças adquiridas na comunidade (COKILL. et al., 2004). Em torno de 30 a 50% da população humana são portadores desta bactéria, sendo que seu principal habitat é a membrana mucosa da nasofaringe. Neste local, estas cepas podem persistir como membro transitório ou persistente da microbiota normal, sem causar nenhuma sintomatologia. Da microbiota nasal, estes patógenos podem, facilmente, contaminar as mãos dos portadores e, desta feita, podem contaminar alimentos

(FUEYO et al., 2000). Os *Staphylococcus aureus* apresentam uma variedade de fatores de virulência, incluindo moléculas de adesão, peptidoglicano, enzimas e toxinas extracelulares (ARCHER et al., 1998). A importância dos *Staphylococcus aureus* como patógenos reside na combinação da virulência mediada por suas toxinas, seu caráter invasivo e seu perfil de resistência aos antibióticos (LE LOIR et al., 2000). A variação genética entre as cepas de *Staphylococcus aureus* está sendo associada com o potencial patogênico destas cepas (BOHACH et al., 1990; DAY et al., 2001). Tal variação ocorre em nível dos genes constitutivos e nos genes acessórios (LAN et al., 2000).

A capacidade de o *Staphylococcus aureus* evadir-se do sistema imune do hospedeiro é conferida à existência de vários fatores de virulência, incluindo hemolisinas, lipases, várias proteases, exotoxinas e enterotoxinas (SOMERVILLE et al., 2001). Vários genes acessórios dos *Staphylococcus aureus* codificam fatores de virulência, tais como Enterotoxinas (*sea* - *see*; *seg* - *ser*; *seu*) (FUEYO, et al.;2005), Toxina da Síndrome do Choque Tóxico (*tst*), toxinas Esfoliativas A e B (*eta* e *etb*), leucocidinas(*pvl*, *lukE-lukD*) e proteínas associadas à superfície como, por exemplo, a Proteína de Ligação ao Colágeno (*cna*), (PROJAN, 1997). Alguns destes genes são freqüentemente transportados por elementos genéticos móveis, tais como fagos e Ilhas de Patogenicidade (SaPIs), as quais são segmentos de DNA de variados tamanhos, potencialmente móveis, codificadores de genes associados à virulência (KAPPER and HACKER, 1999), sendo transferidos

horizontalmente entre as cepas (*sea*, *tst*, *eta*) (BETLEY, et al.,1985; LINDSAY et al.,1998; YAMAGUCHI et al.,2000; YOSHIZAWA. et al.,2000).

No ambiente hospitalar, as cepas de MSSA são geneticamente diversas, porém dentro desta diversidade, algumas cepas são claramente relacionadas e, provavelmente representam linhagem de sucesso (MOORE et al., 2001).

Em cultura, o *Staphylococcus aureus* produz exotoxinas somente quando em alta densidade bacteriana, em sua fase pós-exponencial de crescimento. Na fase pré-exponencial, quando em baixa densidade bacteriana, a bactéria expressa moléculas de superfície, tais como proteínas ligadoras de fibronectinas e proteínas ligadoras de fibrinogênio, as quais permitem a aderência da bactéria e a colonização das células do hospedeiro (Balaban et al., 2000).

Segundo BOHACH et al. (2000), as exotoxinas dos *Staphylococcus aureus* estão enquadradas dentro de dois grupos gerais: **agentes ativos em membranas**, que compreendem as toxinas alfa, beta, delta, gama e leucocidinas; e as **toxinas com atividades de superantígenos (SAGs)**. As toxinas com atividade de superantígenos (SAGs) incluem a família das toxinas pirogênicas (PTs), que são as enterotoxinas estafilocócicas (SEs) a toxina da síndrome do choque tóxico (TSST-1) e a família das toxinas esfoliativas (ETs).

1.1 Toxinas com atividades em membranas:

As cepas de *Staphylococcus aureus* podem produzir quatro classes de citotoxinas, as quais compreendem as quatro hemolisinas, α , β , γ , e δ , como também a leucocidina de Panton-Valentine, designada como PVL.

1.1.1 Hemolisinas

As **hemolisinas** são agentes citotóxicos cuja ação pode auxiliar no poder invasivo da bactéria. O gene codificador para a alfa-toxina, *hla*, foi clonado e seqüenciado (SAKO, et al., 1983). A **alfa-hemolisina** é tóxica a várias células de mamíferos, sendo também hemolítica para eritrócitos de carneiro, dermonecrótica e neurotóxica. Esta toxina causa formação de poros nas membranas celulares, explicando, portanto, sua capacidade em causar lise nos eritrócitos. Os monômeros de alfa-toxina atacam as membranas e, então, formam hexâmeros ou heptâmeros, originando a formação do poro (BHAKDI et al., 1991). Relata-se que tal formação de poro induz a liberação de óxido nítrico pelas células endoteliais e que a alfa toxina induz a apoptose em linfócitos (JONAS et al., 1994) . Vários estudos demonstraram que a alfa-toxina apresenta um efeito favorável no surgimento de doenças. Cepas não produtoras de alfa-toxina foram, em alguns estudos, menos virulentas do que suas ancestrais isogênicas produtoras desta toxina (BRAMLEY, 1989; CALLEGAN, 1994). A alfa-hemolisina está sob controle

do gene regulador *agr* e é produzida na fase pós-exponencial do crescimento bacteriano. Esta toxina produz vários efeitos sobre o hospedeiro, a maioria destes ocorre em função do desequilíbrio osmótico celular devido à perda de íons pelos poros formados (BHAKDI et al., 1991). Como exemplo temos a ativação do metabolismo do ácido aracdônico nas células endoteliais devido ao influxo de cálcio. Isto leva à formação de tromboxane e prostaciclina, os quais são vasos-constritores. Devido ao rompimento celular secundário ao desequilíbrio osmótico, observa-se o aumento da permeabilidade vascular e edema pulmonar (SUTTORP et al., 1985). Como resultado do influxo de cálcio nas plaquetas, causado pela alfa-toxina ocorre a liberação de fatores ativadores da coagulação (BHAKDI et al., 1988).

O gene para **beta-hemolisina** foi clonado e seqüenciado por PROJAN et al. (1989). Está localizado sobre um fragmento de DNA cromossômico *Cla* I de 4Kb. É sintetizada na fase pós-exponencial do crescimento bacteriano. A beta-hemolisina, diferentemente de outras toxinas citolíticas, é uma enzima que apresenta atividade de esfingomielinase (WADSTRON et al., 1972). As diferenças na susceptibilidade dos eritrócitos à beta-hemolisina podem ser explicadas pela quantidade de esfingomielina presente nos diferentes eritrócitos. Tem se observado *in vitro* que a ação da beta-hemolisina é antagonista à ação da alfa-hemolisina. Tal fato se deve à ação da beta-hemolisina sobre a membrana dos

eritrócitos, impedindo, assim, a polimerização da alfa-hemolisina. Isto sugere, portanto, que, enquanto as células vermelhas ou quaisquer outras células contendo esfingomielina em sua membrana representem alvo para a beta-hemolisina, a alfa-hemolisina seja então direcionada para outros alvos.

A **delta-hemolisina** é um peptídeo contendo 26 aminoácidos, o qual potencializa a ação da beta-hemolisina *in vitro*, aumentando suas propriedades hemolíticas (RUZIKOVA, 1994). Porém, seu papel na virulência *in vivo* encontra-se ainda em estudo. Sugere-se que a delta hemolisina possua propriedades surfactantes ou formadoras de canais (BERNHEIMER, 1986).

Figura 1- Representação da ação da alfa-hemolisina de *S. aureus*, sobre a membrana de uma célula eucariota:

Fonte: FINK et al.; 1989

1.1.2 Toxinas Bi-componentes

As cepas de *Staphylococcus aureus* produzem duas classes de **toxinas bi-componentes**, compostas de duas proteínas de ações sinérgicas, secretadas independentemente, referidas como componentes de classe F e classe S. Foram caracterizados quatro loci codificando leucotoxinas bi-componentes em *S. aureus*: *pvl*, *hlg*, *lukE-lukD* e *lukM-lukF'-PV*. Exceto *hlgA*, todos os outros genes são co-transcritos em *tandem*, sendo que os genes codificadores para proteínas semelhantes ao componente LukS-PV (componente S) localizam-se a *upstream* ao gene que codifica a proteína similar ao LukF-PV (componente F). Portanto, convencionalmente, a proteína de classe S corresponde sempre ao primeiro elemento mencionado.

A denominação S e F resulta da velocidade (*Slow and Fast*) com que tais proteínas são eluídas de uma coluna cromatográfica de troca iônica de carboxi-metil-celulose (PREVÓST et al., 2002). Estas toxinas compreendem seis proteínas de classe S, as quais são as primeiras unidades a se ligarem às membranas das células alvo, e cinco proteínas de classe F, as quais correspondem ao segundo elemento para continuar o oligômero em formação. As interações destes componentes induzem a uma rápida ativação e, conseqüente, abertura dos canais de cálcio presentes nas membranas das células alvo, causando um influxo deste cátion na célula. A oligomerização dos componentes S e F conduz à formação de poros hetero-hexaméricos, sobre a superfície de tais células, os quais são

formados por uma proporção equimolar de proteínas S e F e são permeáveis a cátions monovalentes, como Na⁺, K⁺ e etídium (WERNER et al., 2002). As toxinas bi-componentes relatadas neste trabalho compreendem a **leucocidina de Panton-Valentine** (LukS-PV + LukF-PV, ou, simplesmente **PVL**), as **gama-hemolisinas** (HlgA + HlgB e HlgC + HlgB, onde HlgA e HlgC são componentes S e HlgB é um componente F) e a leucocidina LukE-LukD. Estas toxinas são sinergicamente tóxicas (em relação aos componentes S e F) aos leucócitos polimorfo-nucleares, monócitos e macrófagos, tanto de coelhos quanto de humanos, sendo que HlgA + HlgB podem, também, lisar alguns linfócitos T, bem como eritrócitos humanos. A sensibilidade das células vermelhas varia de acordo com a dupla S/F formada. A leucocidina Luk E-D, por sua vez, não é fortemente hemolítica sobre eritrócitos humanos, tampouco é tão leucotóxica, quando comparadas a outras leucocidinas (GRAVET et al., 1998). Qualquer combinação de uma proteína de classe S com uma outra proteína de classe F, heteróloga ou não, pode ser tóxica (PREVÓST et al, 1995). Um exemplo de tal fato é que a interação HlgA + LukD é fortemente indutora de canais de cálcio (GRAVET et al.; 1998). Estas observações sugerem tanto uma diferença nos receptores quanto diferentes formas de oligomerização destas toxinas.

Estudos indicam que quase todas as cepas de *Staphylococcus aureus* produzem gama-hemolisinas (aproximadamente 99%) e somente 2 a 3 % das cepas produzem PVL. Estudos conduzidos por PREVOST et al. (1995) indicam que as cepas *Staphylococcus aureus* possuem dois *locus* separados para dar origem às gama-hemolisinas e PVL. Entre as cepas capazes de produzir ambas as toxinas, três

componentes S (HlgA, HlgC e LukS-PV) e dois componentes F (HlgB e LukF-PV) podem ser produzidos. Estes produtos mostram um alto grau de similaridade entre suas seqüências. Três *open reading frames* (ORF's) compreendem os genes para gama-hemolisinas, *hlg*, localizando-se sobre um *locus* de 4.5 - Kb de um fragmento de DNA cromossômico Sca-I. Os três ORF's, em ordem, são designados como *hlgA*, *hlgC* e *hlgB*, correspondendo aos genes identificados por COONEY et al (1993). Os ORF's *hlgB* e *hlgC* são co-transcritos enquanto que *hlgA* é transcrito separadamente. As toxinas HlgB e HlgC são referidas, tipicamente, como hemolisinas. O *locus* que compreende *hlgA*, *hlgC* e *hlgB* é estreitamente *relacionado* com o *locus lukR*, codificador da leucocidina R. PLOMMET M, et al.(1988) relataram que linhagens de *S. aureus* 5R poderiam ser uma excelente fonte de gama-hemolisinas, uma vez que estas não produzem alfa, beta ou delta-hemolisina. PREVOST et al. (1995) também clonaram genes codificadores de PVL, denominados *lukS-PV* e *lukF-PV*. O locus inteiro, *luk-PV*, estava contido em um fragmento de DNA cromossômico *EcoRV* e consistia de dois ORF's. Os extratos bacterianos do clone exibiram atividade leucotóxica, porém nenhuma atividade hemolítica. *lukS-PV* e *lukF-PV* foram co-transcritos e foram similares ao *hlgC* e *hlgB*, respectivamente. No *locus luk-PV* não foi encontrado nenhum similar ao *hlgA*. A aquisição do *locus luk-PV* é atribuída à ação lisogênica de bacteriófagos (KANECO et al, 1997). Porém uma transmissão horizontal deste *locus* deve ser um evento muito raro, uma vez que nem a perda deste fenótipo em cepas produtoras de tal toxina e tampouco uma dispersão natural entre diferentes isolados foram observados (PREVOST et al., 1995). Com os três componentes S e dois componentes F é possível para uma determinada cepa de *S. aureus* elaborar seis combinações de toxinas, com um componente S e um componente F.

1.2 Toxinas com atividade de superantígenos

Várias das toxinas extracelulares produzidas pelos *Staphylococcus aureus* apresentam propriedades de superantígeno, incluindo as enterotoxinas, as toxinas esfoliativas e a toxina da Síndrome do Choque Tóxico (TSST-1). Os superantígenos afetam o sistema imune através da ligação às proteínas do complexo principal da histocompatibilidade de classe II (MHC II) e ativa tipos específicos de células-T através das regiões variáveis das cadeias beta dos receptores de células T. Como consequência da ativação destas células-T ocorre a liberação de citocinas, tais como Fator de Necrose Tumoral (TNF), várias interleucinas e interferon-gama.

1.2.1 Enterotoxinas Estafilocócicas (SEs)

As enterotoxinas estafilocócicas (SEs) estão dentro da classe das toxinas pirogênicas, com atividade de superantígenos (PTSAgs), cujos membros compartilham relações filogenéticas, estruturais e funcionais entre si (BALBAN et al., 2000). Os genes das enterotoxinas estafilocócicas (*ses*) apresentam um alto percentual de identidade em suas seqüências nucleotídicas (BETTLEY et al., 1992). Antes da descoberta de suas propriedades superantigênicas, as enterotoxinas foram, primeiramente, reconhecidas como potentes agentes eméticos, sendo que, atualmente, estão envolvidas também em várias afecções alérgicas e auto-imunes

como *diabetes mellitus*, esclerose múltipla e artrite reumatóide (MCCORMICK et al.; 2001).

As SEs funcionam como potentes toxinas gastrintestinais e como superantígenos, estimulando a proliferação de células T não específicas (BALABAN et al., 2000). Tais propriedades eméticas e de superantigenicidade destas toxinas são aparentemente distintas e localizam-se sobre diferentes domínios da proteína (DINGES et al., 2000), indicando que elas se comportam como toxinas bifuncionais (HARRIS et al., 1995). Embora estas sejam duas funções distintas, localizadas sobre diferentes domínios da proteína, existe uma alta correlação entre estas atividades. Na maioria dos casos, uma diminuição da atividade de superantigenicidade (devido a uma mutação genética) resulta em uma diminuição da atividade enterotóxica (HARRIS et al., 1993). Porém como estas atividades são interligadas ainda permanece incerto. Uma das hipóteses é que a atividade de enterotoxina pode facilitar a transcitose, capacitando, portanto, a entrada da toxina na corrente sanguínea, permitindo, desta forma, a interação com as células T, conduzindo à atividade superantigênica (BALABAN et al., 2000). Das toxinas pirogênicas, as SEs são as únicas que apresentam atividade emética (LE LOIR, et al., 2000).

Pouco se sabe como as SEs causam os sintomas dos casos de intoxicação alimentar. Estas toxinas podem desencadear um efeito direto sobre o epitélio intestinal e sobre o nervo vago, causando estímulo do centro emético e aumentando a motilidade intestinal. Um achado comum na estrutura das SEs é uma alça de cistina, a qual

apresentou uma considerável importância sobre a atividade emética, baseada em análise de mutantes (DINGES et al.; 2000). A SEI, por sua vez, não apresenta a referida alça de cistina, portanto, seu efeito emético é consideravelmente menor do que o de outras SEs (MUNSON et al., 1998).

A atividade de superantigenicidade das enterotoxinas resulta na presença de receptores de enterotoxinas na superfície das células apresentadoras de antígenos (APC). O termo “superantígeno” foi introduzido em 1989 por MARRACK & KAPPLER para se descrever uma acentuada expansão de células T, mostrando regiões variáveis específicas da cadeia Beta (V-Beta) do receptor de antígeno das células T (TCR), quando exposto a estas toxinas (MCCORMICK et al., 2001). Tais receptores são moléculas de MHC de classe II. Moléculas de enterotoxinas estafilocócicas realizam, portanto, uma ligação cruzada entre estas moléculas de MHC-II e a região variável da cadeia Beta (VB) do receptor de antígenos dos linfócitos T (TCR). Sabe-se que na resposta celular imune, o primeiro evento é o reconhecimento do antígeno pelo receptor de antígeno de células T (TCR), ancorado à membrana dos linfócitos T. O antígeno é apresentado ao TCR na forma de peptídeos ligados a moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC), classe I e II, cujas moléculas constituintes são proteínas ligadas a membranas sobre a superfície das células apresentadoras de antígenos (APC). Este tipo de reconhecimento é a chave para a alta especificidade da resposta imune, onde somente poucas células T podem reconhecer um antígeno específico. As enterotoxinas estafilocócicas, por apresentar comportamento de superantígenos, interagem com várias células T de forma

inespecífica, sendo potente ativador de tais células. Para ativar esta ação, estas enterotoxinas requerem somente o reconhecimento da porção V da cadeia Beta do TCR, promovendo, desta feita, uma ligação entre o TCR e o MHC de classe II das APCs. Os antígenos convencionais, quando apresentados juntos ao MHC, sobre as APCs, requerem reconhecimento por todos os cinco elementos variáveis do TCR(V-Beta, D-beta, J-Beta, V-alfa e J-alfa). Em contraste, os SAGs são principalmente reconhecidos pela porção V-Beta do TCR. Desta forma, estes conseguem estimular em torno de 20% de quase todos os linfócitos T, enquanto os antígenos convencionais estimulam na ordem de 1 : 10000 dos linfócitos T (MCCORMICK et al., 2001). Tal fato resulta em síntese de várias citocinas, linfocinas, IFN e aumento do choque endotóxico, resultando em imunossupressão das células T e B com prejuízo da resposta imune ao agente invasor (JARRAUD et al., 2001). A ampla expansão dos linfócitos T resulta em uma massiva liberação de citocinas pelo hospedeiro. Acredita-se que estas citocinas são as responsáveis pela maioria das conseqüências graves dos SAGs, os quais atuam como vasodilatadores capilares conduzindo à hipotensão, ao choque, à falência de múltiplos órgãos e morte (MCCORMICK et al., 2001).

Foi proposto que as enterotoxinas desencadeiam suas propriedades eméticas ligando-se a receptores específicos no intestino. Isto é confirmado pelo fato de que a intoxicação alimentar estafilocócica (SFP), mediada por estas toxinas, cujos principais achados são vômitos, diarreias e anormalidades histopatológicas características, não é uma infecção, mas sim uma intoxicação, na qual a toxina já havia sido produzida no alimento contaminado, anteriormente à ingestão (HOLMBERG, 1984). Tal ocorrido

permite então especular-se que a bactéria selecionou uma família de toxinas que a permite escapar do ambiente hostil encontrado no trato digestivo. Importantes propriedades compartilhadas por todas SEs são sua habilidade em induzir vômito e gastroenterites após administração oral em primatas, superantigenicidade, conformações similares, estabilidade à pepsina e estabilidade ao calor. Esta última propriedade significa que a atividade biológica da toxina permanece inalterada mesmo após o processamento térmico do alimento (HOLECKOVA et al., 2002).

A heterogeneidade das SEs fornece os critérios para sua diferenciação dentro das classes atualmente reconhecidas (SEA - SEE; SEG - SER; SEU) (FUEYO, et al.; 2005), sendo que a SEC pode ser ainda diferenciada em subclasses (SEC1, SEC2 e SEC3) (MARR et al. 1993). Uma exotoxina estafilocócica envolvida na TSS foi inicialmente designada SEF (BERGDOLL et al.; 1981), não apresentando, porém, atividade biológica, *in vivo*, de uma verdadeira SE (FUEYO et al.; 2005). Com relação à similaridade entre as classes das SEs, 15 % dos resíduos de aminoácidos são completamente conservados. A maioria conservada destes resíduos está localizada nas porções central e C-terminal das seqüências.

Os genes codificadores destas enterotoxinas possuem diferentes suportes genéticos, sendo que a maioria dos quais são elementos genéticos móveis. Nem todos os genes das SEs são controlados pelo sistema *agr*. Desta feita, *seb*, *sec* e *sed* são

dependentes do *agr*, enquanto *sea* e *sej* são *agr* independentes. (LE LOIR et al., 2000).

1.2.1.1 Enterotoxina Estafilocócica A (SEA):

SEA é a enterotoxina estafilocócica mais comum recuperada de surtos de intoxicações alimentares nos EUA, perfazendo 78% de todos os surtos (BALABAN et al., 2000). A habilidade de a enterotoxina A modificar, diretamente, a função dos neutrófilos sugere um importante papel desta enterotoxina na patogênese de algumas doenças (MULLARY, 2001). O gene para SEA (*sea*) é carregado por um bacteriófago temperado. Este gene é composto de 771 pares de base e codifica um precursor de enterotoxina A de 257 resíduos de aminoácidos. Uma porção de 24 resíduos N-terminais é processada resultando, então, na molécula ativa. SEA é expressa na fase exponencial de crescimento, porém não é regulada pelo *agr* (Tremaine et al.; 1993), diferentemente de *seb*, *sec* e *sed*, os quais requerem um *agr* funcional para a máxima expressão.

1.2.1.2 Enterotoxina estafilocócica B (SEB):

A região codificadora do gene *seb* contém aproximadamente 900 nucleotídeos. A proteína precursora contém 267 aminoácidos. O gene *seb* é cromossômico em isolados clínicos relacionados a casos de intoxicação alimentar. Porém, em outras cepas está localizado em um plasmídio de 750 KB.

1.2.1.3 Enterotoxina estafilocócica C (SEC):

SECs são um grupo de proteínas altamente conservadas com importantes reatividades imunológicas cruzadas. Existem três subtipos de SEC antigenicamente distintos: SEC 1, SEC 2 e SEC3. O gene *sec3* contém 801 pares de bases e codifica uma proteína precursora de 267 aminoácidos. O gene *sec3* é estritamente relacionado com o gene *sec1*, com 98% de identidade entre as seqüências nucleotídicas. SEC3 difere das enterotoxinas C1 e C2 por 4 e 9 aminoácidos, respectivamente. O gene *sec2* contém uma *ORF* de 801bp, codificando um precursor de 267 aminoácidos. O gene *sec* está localizado em uma ilha de patogenicidade (FITZGERALD et al., 2001).

1.2.1.4 Enterotoxina estafilocócica D (SED):

O gene *sed* localiza-se sobre um plasmídeo de 27,6 Kb designado piB485. O produto do gene *sed* contém 258 aminoácidos. O polipeptídeo maduro contém 228 aminoácidos. A atividade de superantigenicidade de SED é dependente de Zn^{+2} para uma alta afinidade com o MHC de classe II.

1.2.1.5 Enterotoxina estafilocócica E (SEE):

O gene *see* codifica uma proteína de 29-KDa que é aparentemente processada a uma forma extracelular madura com uma massa molecular de 26 KDa. A identidade na seqüência de DNA indica que SEE, SED e SEA são estritamente relacionadas. O gene *see* é carregado por um fago defeutivo (LE LOIR, 2000).

Estas toxinas, conhecidas pelo envolvimento em gastroenterites, designadas como intoxicação alimentar estafilocócica (SFP), nos anos atuais, receberam uma maior atenção por estarem envolvidas com a Síndrome do Choque Tóxico (TSS) (BOHACH et al., 1990). Como outras PTSAGs, as SEs apresentam propriedades imunomodulatórias e letais necessárias para a TSS. SEs e TSST-1 compartilham propriedades estruturais e biológicas comuns, sugerindo que elas derivam de um ancestral comum (MARRACK et al., 1990). A diferença entre SFP e TSS são bem demonstradas em vários trabalhos e são um reflexo de rotas alternadas de exposição às SEs.

1.2.2 Toxina da Síndrome do Choque Tóxico (TSST-1)

A Síndrome do Choque Tóxico (TSS) é uma doença estafilocócica, caracterizada pelo estabelecimento agudo de febre alta, *rash* eritematoso difuso, descamação da epiderme, hipotensão, hipoalbuminemia, e envolvimento de três ou mais sistemas orgânicos (REINGOLD et al., 1982). Esta síndrome foi primeiramente descrita por TODD et al. (1978), quando estes autores relataram tal sintomatologia em um grupo de sete crianças de 8 a 17 anos com doença febril aguda. Durante os anos que se seguiram ocorreu um aumento no número de casos de TSS, e tal síndrome foi associada com mulheres jovens em período menstrual. Posteriormente, tornou-se evidente que tais casos também ocorriam em mulheres que não estavam no período menstrual, tornando-se notável que tal síndrome poderia acometer qualquer população (HERZER, 2001). Hoje se sabe que sem uma adequada terapia, um choque letal

pode se desenvolver dentro de 24 horas após o estabelecimento dos sintomas (DEURENBERG, et al.; 2005). Sabe-se que são 3 os **critérios para se desenvolver a TSS**: (1) o paciente deve ser infectado ou colonizado por uma cepa de *Staphylococcus aureus*, (2) esta cepa deve produzir a toxina TSST-1 ou toxinas similares, (3) a toxina deve encontrar uma rota de entrada na circulação (HERZER, 2001). Foi proposto que, aos achados clínicos característicos, o **diagnóstico** da TSS fosse incorporado a **achados laboratoriais importantes**, como: Isolamento de *S. aureus* de mucosa ou site normalmente estéril; produção de toxina associada à TSS pela cepa isolada; carência de anticorpos relacionados à toxina em questão durante a fase aguda da doença; e desenvolvimento de anticorpos contra tal toxina durante a fase de convalescença. Este item, porém, não é muito adequado uma vez que vários pacientes não desenvolvem anticorpos neutralizantes para esta toxina (MCCORMICK et al.; 2001).

A TSS é uma das mais comuns causas de morte nas unidades de terapia intensiva. A TSS é separada em dois eventos distintos: Menstrual e não-menstrual. Em 1980, foi descrito um quadro clínico de TSS epidêmico em mulheres que faziam o uso de tampões absorventes, principalmente aqueles de alta absorção. Sabe-se que isto é devido à habilidade desta toxina em atravessar barreiras mucosas. A doença foi relacionada com cepas de *S. aureus* toxigênicas, principalmente aquelas do grupo fágico I, localizadas em mucosa vaginal ou da cérvix uterina. Sabe-se que mais de 99% dos casos de TSS menstrual é relacionado ao uso de tampões absorventes. Acima de 45% de todos os casos de TSS é não menstrual (HERZER, 2001). Embora

a TSS não menstrual possa ocorrer em associação com qualquer infecção estafilocócica, foram descritas algumas formas principais desta doença. Estas incluem TSS pós-cirúrgica, TSS associada à gripe influenza, síndrome eritematosa e TSS associada ao uso de diafragmas como método contraceptivo (MCCORMICK et al.; 2001).

A **apresentação clínica** do choque inclui inflamação, estabelecimento agudo de febre alta, rash eritematoso difuso, vômito, diarreia, mialgias, falência circulatória e envolvimento de três ou mais sistemas orgânicos (síndrome de disfunção de múltiplos órgãos - MODS) (PARRILO et al., 1993). O LPS, endotoxina presente na membrana externa das bactérias Gram-negativas, induz vários dos achados associados com o choque séptico. O LPS geralmente desencadeia o choque séptico através da ativação excessiva de macrófagos, o que resulta na superprodução de citocinas, incluindo TNF e IL-1 e IL-6. Porém, as bactérias Gram-positivas, especialmente os *Staphylococcus aureus*, os quais carecem de membrana externa e, além do mais, não produzem LPS, são também capazes de induzirem o choque séptico. É sugerido que os superantígenos produzidos pelos *Staphylococcus aureus* desenvolvem um papel importante no choque séptico, através do estímulo da proliferação das células-T, induzindo a liberação de citocinas. A síndrome foi primeiramente descrita por TODD et al. (1978) como a principal doença sistêmica associada com cepas de *S. aureus* não invasivas, sendo designada como TSS por estes investigadores. Os pacientes com TSS normalmente não apresentam bacteremia detectável, ainda que se

encontrem achados clínicos da doença, sugerindo que a TSS resulta de uma intoxicação com a toxina bacteriana (MCCORMICK et al., 2001).

A TSST-1 foi a primeira toxina relacionada com a TSS, sendo que hoje é aceita como a responsável em torno de 75% dos casos clínicos. É codificada por um gene *tstH* (sendo que H refere-se a isolados de humanos), presente no cromossomo. Este gene pode ser encontrado em uma das duas ilhas de patogenicidade, inserindo-se tanto próximo a *tyrB* (SaPI1), quanto em *trp* (SaPI2) (LYNDSAY et al., 1998). O gene *tst* foi encontrado, também, na ilha de patogenicidade SaPI_{bov}. Os principais isolados oriundos de TSS menstrual contém *tstH* inserido próximo ao locus *trp*, sendo, portanto, considerado contendo SaPI2 (MCCORMICK, et al.;2001). É responsável por aproximadamente todos os casos de TSS menstrual, sendo que a TSS não menstrual é também atribuída às enterotoxinas estafilocócicas tipos B (SEB) e C (SEC) (MCCORMICK et al.; 2001). A toxina foi caracterizada e identificada como uma nova exotoxina de *S. aureus*, por dois pesquisadores (SCHLIEVERT & BERGDOLL). A TSST-1 é produzida em torno de 100% das cepas de *S. aureus* isolados de mucosa cervical ou vaginal de mulheres que apresentaram TSS, e em aproximadamente 50% dos isolados de outros sítios corpóreos de pacientes com TSS não-menstrual. Somente a TSST-1 foi envolvida com os casos de TSS menstrual, devido à característica da TSST-1 em atravessar as barreiras mucosas, diferentemente das enterotoxinas (SCHLIEVERT et al.; 2000). A TSST-1 induz a uma resposta humoral in vivo a qual se acredita ser protetora. Em torno de 90 a 95% das mulheres de meia idade apresentam títulos de anticorpos detectáveis contra esta toxina. Pacientes com TSS produzem uma resposta ineficaz à TSST1, apresentando títulos inferiores a 1:5,

enquanto que indivíduos saudáveis apresentam títulos acima de 1:100 (HERZER, 2001.).

1.2.3 Toxinas Esfoliativas:

Foram descritas duas toxinas esfoliativas distintas sorologicamente, designadas como **toxina esfoliativa A** e **toxina esfoliativa B** (ETA e ETB, respectivamente). Ambos os genes são designados como *etA* e *etB*, sendo que suas seqüências já foram determinadas (LEE et al., 1987). Dentre as manifestações clínicas causadas por cepas produtoras de ETs, destacam-se a síndrome da pele escaldada estafilocócica (SSSS), a qual pode manifestar-se em sua forma clássica, generalizada pela epiderme, ou localizada, caracterizando o impetigo. O impetigo, por sua vez, pode apresentar-se como bolhoso ou não-bolhoso (YAMASAKI et al., 2005). A síndrome da pele escaldada (SSSS), observada usualmente em recém nascidos (Doença de Ritter), geralmente em forma de surtos hospitalares (HELLALI et al., 2004), é uma dermatite esfoliativa mediada pela infecção com cepas de *Staphylococcus aureus* produtoras tanto de ETA quanto de ETB. Porém, a presença do gene *etb* é fortemente associado à SSSS generalizada, enquanto que o gene *eta* associa-se com o impetigo bolhoso (YAMASAKI et al., 2005) . Atualmente relaciona-se a ação destas toxinas como serino-proteases (Dancer et al., 1990). Estas toxinas desencadeiam uma separação intradérmica do estrato granular pela clivagem específica da desmogleína-1, a qual é uma proteína desmossomal que media a adesão intercelular dos queratinócitos presentes na camada granular (YAMASAKI et al., 2005). Na SSSS, quando se

observa a ocorrência de bolhas, o líquido intradérmico é estéril, sendo que a cepa infectante é usualmente recuperada de sítios distantes da lesão, como garganta ou cavidade nasal (YAMASAKI et al.; 2005). Alguns autores atribuem uma forte predominância da ETB nesta síndrome, em relação à ETA (KANZAKI et al.; 1997). Trata-se de uma condição típica de crianças, embora possa também ocorrer em adultos (LISA, 2004). Esta doença inicia-se abruptamente com febre e eritema, geralmente próximo à boca, podendo se espalhar pelo corpo inteiro, em poucos dias, seguido pela formação de bolhas estéreis na epiderme, as quais provocam a separação das camadas epidérmicas, especialmente em nível do estrato granuloso (AMAGAI et al., 2002). A esfoliação da epiderme, a qual predispõe o paciente a infecções secundárias por patógenos oportunistas (LADHANI et al.; 1999), ocorre em um sítio distante do local da infecção. Acredita-se que a SSSS origina-se através da absorção das ETs produzidas por cepas destes sítios longínquos. Estas toxinas atingiriam a circulação sistêmica por difusão, para chegar aos sítios alvos (YAMASAKI et al.; 2005). Segundo LADHANI (2003) a alta incidência da SSSS generalizada em crianças seria em função do *clearance* renal menos eficaz destas toxinas e a imaturidade imunológica observada nesta população, resultando em baixos títulos de anticorpos anti-ETs. A mortalidade em crianças situa-se em torno de 3%, quando em uso de antibioticoterapia apropriada, sendo usualmente associada com infecções secundárias (GEMMELL, 1995). Porém, surtos hospitalares ainda continuam a ser relatados (MACKENZIE, et al., 1995). Em contraste, no impetigo bolhoso, o qual é uma infecção localizada também provocada por cepas de *S. aureus* produtoras de ETs, o líquido é formado por exsudato purulento, sendo que estas cepas são usualmente isoladas deste líquido. Esta manifestação clínica pode ocorrer em

qualquer idade (YAMASAKI, et al; 2005). Koning e colaboradores demonstraram a relação de cepas produtoras de ETB com PVL e um plasmídeo resistente a várias drogas, denominado pSK41 (Gillet et al.; 2002). Estes autores relataram que a relação entre tais fatores de virulência contribui para a gravidade do impetigo não-bolhoso.

A ETA é codificada por um gene cromossômico (*eta*), dentro de um segmento de 43 Kb de um fago temperado (YAMAGUCHI et al., 2000) e é a mais comum das toxinas esfoliativas. Já a ETB é codificada por um plasmídeo de aproximadamente 38,2 a 38,5 Kb. ETA e ETB compartilham uma significativa identidade entre suas seqüências de aminoácidos, apresentando, também, importantes propriedades biofísicas comuns (LEE et al., 1987). ETA é uma toxina muito estável, a qual é resistente ao calor extremo, enquanto ETB é sensível ao calor (LISA, 2004). Recentemente, foi identificada uma nova toxina esfoliativa, ETD, de uma cepa isolada de ferida. Foi inicialmente relacionada a uma *ORF* com uma significativa homologia às ETs conhecidas (YAMAGUCHI et al., 2002.). Uma quarta toxina esfoliativa, potencialmente ativa em humanos, denominada ETC, foi isolada em infecções em cavalos, e apresentou atividades em modelos de ratos neonatais (SATO et al., 1994), porém ainda não foi associada com doença em humanos. As ETs, como a maioria das proteínas estafilocócicas associadas com virulência, estão codificadas em elementos genéticos móveis (NOVICK, 2003), permitindo a transferência horizontal destes fatores de virulência. Por uma razão ainda não muito bem compreendida, as toxinas esfoliativas não são co-produzidas com TSST-1, pelas cepas de *Staphylococcus aureus*, embora as Ets possam ser co-produzidas com as demais enterotoxinas

(GRAVET et al., 2001). Como a maioria dos fatores de virulência dos *Staphylococcus aureus*, as ETs são reguladas pelo locus *agr* (NOVICK, 2003).

Existem várias controvérsias na associação das ETs como superantígenos. Embora na SSSS possa se encontrar eritema, febre e focos purulentos, estes não estão sempre presentes. Embora tenha sido demonstrado o estímulo específico de células T, a SSSS geralmente carece de sintomas sistêmicos associados à síndrome mediada por superantígenos. Porém, a superantigenicidade fica fundamentada sobre o fato de que a bactéria não é necessariamente encontrada em todas as lesões bolhosas presentes na SSSS (VATH et al., 1999).

1.3 Locus *agr*

A expressão dos genes de exotoxinas é controlada por reguladores, tais como o *agr* (accessory gene regulator) (PROJAN, 1997), sendo identificadas quatro classes diferentes e mutuamente inibitórias deste gene (JARRAUD et al., 1997; JI et al., 1997.). O locus *agr* é um regulador positivo para as exotoxinas secretadas durante a fase pós-exponencial de crescimento, porém é um regulador negativo para os fatores de virulência associados à superfície. As exotoxinas reguladas pelo *agr* não são sintetizadas, ou são significativamente reduzidas em *agr* mutantes defectivos (RECSEI et al., 1986). A produção de alfa-hemolisina, delta-hemolisina e TSST-1 parecem ser fortemente reguladas pelo *agr*. Estas toxinas são produzidas em altas quantidades por cepas *agr*⁺ e são produzidas em quantidades ínfimas em cepas *agr*⁻, sendo referidas como **toxinas de classe-I**. Já as beta-hemolinas, as enterotoxinas B

e C e a toxina esfoliativa A parecem não ser tão fortemente reguladas pelo *agr*, uma vez que estas proteínas são produzidas em altas quantidades em cepas *agr*⁺ e em quantidades moderadas em cepas *agr*⁻, sendo referidas como **toxinas de classe II**. São consideradas como **proteínas de classe III** a proteína A, a coagulase e a proteína de ligação à fibronectina, as quais são feitas em altas concentrações em cepas *agr*⁻, porém em baixas concentrações em cepas *agr*⁺. O *locus agr* foi seqüenciado e clonado, compreendendo, pelo menos, cinco genes: *agrA*, *agrB*, *agrC*, *agrD* e o gene para a delta-hemolisina (*hld*) (PENG et al., 1989). O *locus agr* parece ser um sistema regulatório de dois componentes, com o *agrD* originando um componente sinalizador e o *agrA* codificando um ativador de transcrição. Os dois transcritos principais produzidos pelo *agr* são designados como RNAII (*agr* A, B, C, D) e RNA III (*hld*). O RNA III age primeiramente para iniciar a transcrição dos fatores de virulência.

Os genes codificadores de fatores de virulência abordados neste trabalho são os seguintes: enterotoxinas A, B, C, D e E (*sea*, *seb*, *sec*, *sed* *see*); Toxina da Síndrome do Choque Tóxico (*tst*); Toxinas Esfoliativas A e B (*eta* e *etb*); Leucocidina de Panton-Valentine (*pvl*); Leucocidina E-D (*luk-E-lukD*); e as hemolisinas: Alfa, Beta e Gama (*hla*, *hlb*, *hlg*). Além de tais genes serão estudados o tipo do *locus agr* presente em cada cepa.

Por seu importante papel no controle dos genes de virulência de *Staphylococcus aureus*, tal gene tornou-se, na atualidade, um alvo importantíssimo na terapia, uma

vez que sua resposta pode ser controlada por peptídeos sintéticos (MAYVILLE et al., 1999). Como tais respostas são *agr* específicas e como a distribuição dos tipos de *agr* em cepas clínicas é pouco conhecida, torna-se importante o conhecimento da prevalência do tipo *agr* em cepas nosocomiais.

2. Objetivos

2.1. GERAL

Caracterização dos isolados clínicos de *Staphylococcus aureus* sensíveis à oxacilina quanto a presença dos principais genes codificadores de exotoxinas e os tipos polimórficos do *locus agr*.

2.2. ESPECÍFICOS

2.2.1. Amplificar os principais genes que codificam exotoxinas produzidas por cepas de *Staphylococcus aureus* sensíveis a oxacilina.

2.2.2. Estudar o polimorfismo do *locus agr* e classificar os perfis presentes nas cepas OSSA estudadas.

2.2.3. Determinar a frequência dos genes codificadores de fatores de virulência encontrados nas cepas estudadas, confrontando-os com o perfil *agr*, de acordo com a procedência: material clínico ou alimentos.

3. Material e métodos

3.1. Amostras bacterianas:

No presente estudo foram utilizados 37 isolados de *Staphylococcus aureus* provenientes de 12 laboratórios de hospitais públicos e privados brasileiros. Estes isolados foram confirmados como *S. aureus* sensíveis a oxacilina (**OSSA**), no *screening* para oxacilina. Destes 37 OSSA, sete foram isolados de alimentos responsabilizados por casos de toxi-infecção alimentar. A escolha das amostras foi baseada na heterogeneidade do material clínico e de alimentos provenientes de casos de toxi-infecção alimentar.

Tabela 1 - Distribuição das cepas estudadas de acordo com a procedência e fonte de isolamento.

n	Cepas	Procedência	Material
01	C1	Hosp. A	LCR
02	C2	Hosp. A	LP
03	C3	Hosp. A	Sg
04	C4	Hosp. A	LCR
05	C5	Hosp. A	LP
06	C6	Hosp. B	Sg
07	C7	Hosp. B	
08	C8	Hosp. C	Sg
09	C9	Hosp. C	Sg
10	C10	Hosp. C	Sg
11	C11	Hosp. D	Sg
12	C12	Hosp. D	Sg
13	C13	Hosp. E	Sg

14	C14	Hosp. E	Sg	
15	C15	Hosp. F	Sg	
16	C16	Hosp. F	Sg	
17	C17	Hosp. G	Sg	
18	C18	Hosp. H		Sg
19	C19	Hosp. H	Sg	

n	Cepas	Procedência	Material
20	C20	Hosp. H	Sg
21	C21	Hosp. H	Sg
22	C22	Hosp. I	Sg
23	C23	Hosp. J	Sg
24	C24	Hosp. L	Sg
25	C25	Hosp. L	Sg
26	C26	Hosp. L	Sg
27	C27	Hosp. L	Sg
28	C28	Hosp. M	Sg
29	C29	Hosp. N	Sg
30	C30	Hosp. N	Sg
31	Al-1	L-1	Al-
32	Al-2	L -2	Al-
33	Al-3	L -3	Al-
34	Al-4	L -4	Al-
35	Al-5	L -5	Al-
36	Al-6	L -6	Al-
37	Al-7	L -7	Al-

*Hosp A - N: Hospitais de diferentes cidades brasileiras onde as cepas foram isoladas

** L1 - 7: Laboratório de microbiologia de alimentos onde foram isoladas 7 cepas oriundas de alimentos relacionados com quadros de toxi-infecção alimentar (anexo-1)

*** LCR- Líquido Céfalo-Raquidiano; LP –Líquido Pleural; Sg –sangue; Al –Alimentos relacionados a episódios de toxi-infecção alimentar.

3.2. Triagem para a confirmação da sensibilidade a oxacilina:

Todos os isolados foram submetidos à triagem para confirmação da sensibilidade à oxacilina através do método descrito pelo NCCLS (2005) que utiliza o ágar Mueller-Hinton contendo 6µg/mL de oxacilina e 4% de cloreto de Sódio (NaCl). O inóculo foi aplicado na placa, através do uso de um swab, embebido em uma suspensão bacteriana equivalente à escala 0,5 de McFarland. A placa foi incubada a 35°C por exatas 24 horas. A observação de uma ou mais colônias na área de aplicação do

inóculo definiu o resultado como positivo, ou seja, a cepa foi considerada resistente à oxacilina.

3.3. ANÁLISE DO POLIMORFISMO DO DNA POR ELETROFORESE EM CAMPO PULSADO (PFGE)

3.3.1. Extração do DNA genômico para PGFE

As cepas de *Staphylococcus aureus* foram semeadas em ágar-sangue de carneiro a 5% (AS) (OXOID, England) e incubadas a 37°C durante 24 horas. Posteriormente foram repicadas em caldo de soja-tripticaseína (TSB) (DIFCO, USA) e incubadas a 37°C por uma noite. Após esse período, centrifugou-se as amostras a 3.345g durante 10 minutos. O sedimento foi ressuspenso em 1mL de solução salina estéril e transferido para um tubo de microcentrífuga previamente

pesado. Essa suspensão foi centrifugada a 23.100g durante 15 minutos e o sobrenadante foi descartado. A seguir, ressuspendeu-se o sedimento em 1mL de solução salina estéril; centrifugou-se a 23.100g durante 15 minutos e descartou-se o sobrenadante. Esse procedimento foi repetido três vezes. O sedimento foi então pesado e re-suspenso em EDTA 50mM pH8,0, para uma concentração final de 100µg de massa bacteriana por µL. Desta suspensão, transferiu-se 15µL para um tubo de micro-centrífuga contendo 215µL de tampão EC (anexo II), adicionado de 250µL de agarose de baixo ponto de fusão a 2% (Sigma, USA) e 20µL de solução de lisostafina (100µg/mL) (Sigma, USA). Esta suspensão foi transferida para os moldes onde permaneceu por 30 minutos a 4°C, para que os blocos se solidificassem. Após esta

etapa, os blocos foram transferidos para uma placa de cultura de células de 24 orifícios, contendo 2mL de tampão EC em cada orifício e incubadas a 37°C por um período de cinco horas, sob agitação suave. Após a incubação, lavou-se os blocos com 2,5mL de tampão CHEF TE (anexo II), incubando-se, a seguir, com 2mL de tampão ES (anexo II), adicionado de 100µL de solução de proteinase K (20mg/mL) (GibcoBRL, Life Technologies, USA), por uma noite à temperatura de 50°C. Os blocos foram então lavados com 2,5mL de tampão CHEF TE (4 lavagens com incubações de 1 hora cada) e armazenados nesta solução até serem submetidos à digestão enzimática e eletroforese (PFALLER, 1993).

3.3.2. Digestão enzimática

A digestão do DNA cromossômico foi realizada com a enzima de restrição *Sma*I (Amersham Pharmacia Biotech, USA), que reconhece e cliva seqüências de nucleotídeos que aparecem poucas vezes ao longo do DNA de *Staphylococcus aureus* (12 a 20 sítios de restrição) (PREVOST et al., 1992; STRUELENS et al., 1992). Para o tratamento com enzimas de restrição, transferiu-se um bloco de agarose de cada amostra para uma placa de cultura de células de 96 orifícios contendo 300µL de tampão DNS. A seguir, o tampão DNS foi retirado e novamente adicionados 300µL de tampão DNS, incubando-se os blocos a temperatura ambiente durante 1 hora. Este processo foi repetido 4 vezes. Após este período, substituiu-se o tampão DNS por 200µL de tampão da enzima de restrição e o bloco foi incubado a

temperatura ambiente por 2 horas. Em seguida, descartou-se o tampão e então foram adicionados 200µL de tampão da enzima e 40µL da enzima *Sma*I e os blocos, então, foram incubados por 2 horas a 4°C e a seguir por 15 horas a 30°C (PFALLER, 1993)

3.3.3. Eletroforese em Campo Pulsado:

A eletroforese em campo pulsado foi realizada em gel de agarose a 1% (Sigma, USA) em 0,5%TBE (90mM Tris, 90mM ácido bórico, 2mM EDTA [Amersham Pharmacia Biotech, USA]) (SAMBROOK et al., 1989), no equipamento CHEF DRII System (BIO-RAD, USA) com intervalos de tempo de pulso de 1 a 30 segundos por 24 horas, ângulo de 120°, temperatura de 14°C e voltagem de 6,0 volts/cm (PFALLER, 1993).

Após a separação, corou-se os géis com solução aquosa contendo 0,5µg/mL de brometo de etídio (Sigma, USA) e foram fotografados sob transiluminação com luz ultravioleta. Foi utilizado como padrão de peso molecular Lambda DNA ladder PFG (New England Biolabs, Inc., USA), com extensão das bandas de 48,5Kb até 1,0Mb (PFALLER, 1993). Utilizou-se como controle, cepa de *S. aureus* ATCC 25923. A análise das bandas obtidas pela eletroforese,, foi realizada de maneira visual, de acordo com o guia de interpretação de Eletroforese de campo pulsado, proposto por TERNOVER et al. (1995). (Tabela 2).

Tabela 2- Critérios para interpretação de eletroforese de campo Pulsado (PFGE)

Categorias	Nº de diferenças	Nº de fragmentos	Interpretação
	genéticas	diferentes	

Semelhantes	0	0	Cepas fazem parte do
Relacionadas	1	2-3	mesmo clone cepas são
Possivelmente	2	4-6	consideradas como
relacionadas			subgrupo
Diferentes	Maior ou igual a 3	maior ou igual a 7	cepas possivelmente
			relacionadas
			cepas diferentes

Fonte: TERNOVER et al., 1995

3.4. Obtenção do DNA Genômico para as amplificações:

O DNA total foi extraído através da técnica de extração fenol-clorofórmio (SAMBROOK et al., 1989). As cepas foram cultivadas *overnight* em caldo LB e ressuspensas em tampão de lise (50mM Tris, pH 8, 5mM EDTA pH 8, 50mM NaCl). A lisostafina (concentração final de 20mg/L) foi utilizada para a fase de rompimento das células. Lisozima e proteinase K foram utilizadas para lise das proteínas, que foram removidas do meio através de separação de fases com fenol-clorofórmio-álcool isoamílico. O DNA restante na fase aquosa foi precipitado com etanol absoluto gelado e centrifugado no equipamento Sorvall RC2-B (rotor SS34), aderindo à parede do tubo. Posteriormente foi solubilizado em tampão TE (10mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8) e armazenado a -20°C.

A quantificação do DNA e sua integridade foram verificadas através de eletroforese em gel de agarose 0.8%, comparando-se com um padrão de massa molecular conhecido (*High DNA Mass™ Ladder - Invitrogen™*). O gel foi corado com solução de brometo de etídio (*Invitrogen™*) na concentração final de 0,5 µg/mL e as suas bandas foram visualizadas sob luz ultravioleta(UV).

3.5. Detecção dos genes codificadores dos fatores de virulência e o tipo de *agr* presente:

3.5.1 PCR para detecção dos genes dos principais fatores de virulência:

Foram utilizados 13 pares de iniciadores para a amplificação de estruturas específicas para cada um dos 13 genes relacionados aos fatores de virulência pesquisados (tabela 4). Como controles internos foram utilizadas cepas padrões que contêm os genes codificadores dos fatores de virulência pesquisados.

Tabela 3 - Cepas controle-positivo para cada gene de toxina pesquisado

Gene de toxina	<i>eta</i>	<i>et b</i>	<i>hla,hlb,hlg</i>	<i>tst</i>	<i>sea</i>	<i>seb</i>	<i>sec</i>	<i>sed</i>	<i>pvl</i>	LukED
Cepa Padrão	ZM	N5	N315	N315	Mu50	T116	N315	RN4220	MR108	N315

eta- Gene codificador para Toxina Esfoliativa A; **etb**- Gene codificador para Toxina Esfoliativa B; **hla** - Gene codificador para alfa-hemolisina; **hlb** - Gene codificador para beta-hemolisina **hlg** - Gene codificador para gama - hemolisina; **tst** - Gene codificador para TSST-1; **sea** - Gene codificador para enterotoxina A ;**sec** - Gene codificador para enterotoxina C; **sed** - Gene codificador para enterotoxina D; **pvl** - Gene codificador para Leucocidina Panton-Valentine; **LukED** - Gene codificador para leucocidina E-D.

As cepas ZM, N5, RN4220 e MR108 foram doadas pela professora doutora Teruyo Ho e Dr Keiichi Hiramatsu, da Universidade de Juntendo, Tóquio, como portadoras dos genes mencionados na tabela 3. A cepa Mu50 foi citada por KURODA et al., 2001, como carreadora do gene *sea*. A cepa N315 apresenta seu genoma publicado na *lancet*, com a referência: 357 (9264), 1225-1240 (2001). A cepa T116 teve seu amplicon para gene *seb* sequenciado no centro de estudos do genoma humano no Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.

Tabela 4 – Iniciadores utilizados para as toxinas em estudo

<u>Toxina</u>	<u>Gene</u>	<u>Iniciador</u>	<u>Sequência de nucleotídeos</u>
SEA	<i>sea</i>	SEA-1	5' - GAAAAAAGTCTGAATTGCAGGGAACA - 3'
		SEA-2	5' - CAAATAAATCGTAATTAACCGAAGATTTC - 3'
SEB	<i>seb</i>	SEB-1	5' - ATTCTATTAAGGACACTAAGTTAGGGA - 3'
		SEB-2	5' - ATCCCGTTTCATAAGGCGAGT - 3'
SEC	<i>sec</i>	SEC-1	5' - GTAAAGTTACAGGTGGCAAACTTG - 3'
		SEC-2	5' - CATATCATACCAAAAAGTATTGCCGT - 3'
SED	<i>sed</i>	SED-1	5' - GAATTAAGTAGTACCGCGCTAAATAATATG - 3'
		SED-2	5' - GCTGTATTTTTCCTCCGAGAG - 3'
SEE	<i>see</i>	SEE-1	5' - CAAAGAAATGCTTTAAGCAATCTTAGGC - 3'
		SEE-2	5' - CACCTTACCGCCAAAGCTG - 3'
TSST-1	<i>tst</i>	TST-1	5' - TTCACTATTTGTAAAAGTGTCAGACCCACT - 3'
		TST-2	5' - TACTAATGAATTTTTTATCGTAAGCCCTT - 3'
ETA	<i>eta</i>	mpETA-1	5' - ACTGTAGGAGCTAGTGCATTTGT - 3'
		mpETA-3	5' - TGGATACTTTTGTCTATCTTTTCATCAAC - 3'
ETB	<i>etb</i>	mpETB-1	5' - CAGATAAAGAGCTTTATACACACATTAC - 3'
		mpETB-2	5' - AGTGAACCTTATCTTTCTATTGAAAAACACTC - 3'

Toxina	Gene	Iniciador	Sequência de nucleotídeos
PVL comps S e F	<i>lukS-PV</i>	PVL-1	5' ATCATTAGGTAAAATGTCTGGACATGATCCA- 3'
	<i>lukF-PV</i>	NPVL-2	5' - GCATCAASTGTATTGGATAGCAAAAGC - 3'
LukE-LukD	<i>lukE-lukD</i>	LUKED-1	5' - TGAAAAAGGTTCAAAGTTGATACGAG - 3'
		LUKED-2	5' - TGTATTTCGATAGCAAAAGCAGTGCA - 3'
HLA	<i>hla</i>	HLA-1	5' - CTGATTACTATCCAAGAAATTCGATTG - 3'
		HLA-2	5' - CTTTCCAGCCTACTTTTTTATCAGT - 3'
HLB	<i>hlb</i>	HLB-1	5' - GTGCACTTACTGACAATAGTGC - 3'
		HLB-2	5' - GTTGATGAGTAGCTACCTTCAGT - 3'
HLG	<i>hlg</i>	mpHLG-1	5' - GTCAYAGAGTCCATAATGCATTTAA - 3'
		mpHLG-2	5' - CACCAAATGTATAGCCTAAAGTG - 3'

Iniciadores sintetizados conforme JARRAUD et al., 2002

SEA – SEE: enterotoxinas A, B, C, D, E; **TSST-1:** Toxinas associada à síndrome do Choque Tóxico; **ETA:** Toxina Esfoliativa A; **ETB:** Toxina Esfoliativa B; **PVL:** Leucocidina de Pantón – Valentine; **LukE-LukD** : leucocidina E-D; **HLA:** alfa-hemolisina; **HLB:** Beta-hemolisina; **HLG:** Gama-hemolisina

Obs.: Acompanhando cada toxina, encontra-se o seu respectivo gene codificador, sempre representado em itálico e em caixa baixa.

Para amplificação das estruturas gênicas correspondentes aos genes das toxinas em estudo, seguiu-se o seguinte protocolo descrito por JARRAUD *et al* (2002), com a diluição prévia de 1:100 do DNA obtido. Utilizou-se volume de 20µL de uma mistura para reação contendo 2µL de DNA, 0,5 unidades de Taq polimerase e uma concentração final dos seguintes componentes: 200µM de cada dNTP; 1.5mM de MgCl₂; 75mM Tris-HCl pH 9,0; 20mM (NH₄)₂SO₄; 0,01% Tween 20; 250nM dos *primers*. Trinta ciclos de amplificação foram executados, cada um

consistindo de 60s a 95°C, 60s a 55°C e 2 minutos a 72°C. Cada teste de PCR foi controlado com controles positivos de cepas-padrão com os genes de virulência em estudo e controles negativos com amostras livre de microrganismos. Dez microlitros de produto de PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose a 0,8% e visualizado sob luz ultravioleta após coloração com brometo de etídio.

3.5.2. Determinação do perfil do polimorfismo do *locus agr*:

Tabela 5 – Iniciadores utilizados para a classificação do locus *agr*:

Iniciador	Sequência de nucleotídeos
PAN- <i>agr</i>	5' - ATGCACATGGTGCACATGC - 3'
<i>agr</i> -I	5' - GTCACAAGTACTATAAGCTGCGAT - 3'
<i>agr</i> -II	5' - TATTACTAATTGAAAAGTGGCCATAGC - 3'
<i>agr</i> -III	5' - GTAATGTAATAGCTTGTATAATAATACCCAG - 3'

Sequência de iniciadores conforme JARRAUD et al., 2002

Para amplificar o *locus agr* em estudo, utilizou-se o iniciador folowed PAN-*agr*, o qual anela-se em uma região comum a todos os tipos de *agr* polimórficos descritos. Com este iniciador foram utilizados, em cada reação, cada um dos iniciadores reversos *agrl*, *agrlI* e *agrlII*, os quais anelam-se em segmentos específicos a cada um dos respectivos tipos polimórficos I, II ou III, respectivamente. Utilizou-se, para a reação de PCR, um volume de 20µL de uma mistura contendo 2µL de DNA (diluído 1:100), 0,5 unidades de Taq polimerase e uma concentração final dos seguintes componentes: 200µM de cada dNTP; 1.5mM de MgCl₂; 75mM Tris-HCl pH 9,0; 20mM (NH₄)₂SO₄; 0,01% Tween 20; 250nM dos *primers*. Trinta ciclos de amplificação foram

executados, cada um consistindo de 60s a 95°C, 60s a 55°C e 2 minutos a 72°C. Cada teste de PCR foi controlado com controles positivos de cepas-padrão com os subtipos do *locus agr* em estudo e controles negativos com amostras livre de microrganismos. Dez microlitros de produto de PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose a 0,8% e visualizado sob luz ultravioleta após coloração com brometo de etídio. Como controle positivo foram utilizadas cepas controles portadoras dos principais tipos de *agr* isolados no Brasil.

Figura 2- Representação dos genes *agr* A, C, D e B e as regiões utilizadas para as amplificações dos segmentos polimórficos dos tipos 1, 2, 3 e 4 do *agr*

Desenho elaborado por "McCulloch et al." em XXIII Congresso Brasileiro de Microbiologia, 13/1240-2, 2005"

Tabela 6 - Cepas padrões utilizadas para classificação do polimorfismo do locus *agr*

<i>agr</i>			
Tipo <i>agr</i>	I	II	III
cepa	R137	N315	ATCC 25923

Tipo de *agr* confirmado por sequenciamento no projeto genoma, IB, USP.

3.6. Eletroforese em gel de agarose:

Para visualização e análise do fragmento de DNA amplificado na reação da PCR, um gel de agarose foi preparado a 0,8% em tampão 0,5 X TBE (Trisma base - 890 mM,

EDTA - 25 mM, ac. bórico - 89 mM). Para a verificação dos tamanhos dos produtos de PCR, alíquotas desta amostras, assim como um padrão de massa molecular conhecido (1Kb *DNA Ladder* - Invitrogen™), misturados a uma solução tampão (azul de bromofenol 0,25%; xileno cianol FF 0,25%; glicerol 30%) foram submetidos a separação eletroforética por cerca de 45 minutos a 100 volts. O gel foi corado e visualizado como descrito no item 3.4.

3.7. Determinação do tamanho dos fragmentos do DNA amplificados:

Para a obtenção da imagem do gel de agarose (corado previamente com brometo de etídio) tanto fotográfica quanto digital, foi utilizado o sistema *Photodocumentation System* Modelo: DP-001.FDC Versão 10 (*Vilber Loumart, Marne-lavallée Cedex 1 - França*). A imagem fotográfica foi impressa pelo sistema *Video Graphic Printer* UP-895CE(SONY).

Após obtenção da imagem digital, os tamanhos dos fragmentos de DNA foram analisados através do programa *PhotoCaptMw* Versão 10.01 para *Windows*.

4. Resultados

4.1. Triagem para verificação da sensibilidade à oxacilina

Todos os isolados utilizados neste estudo foram caracterizados como OSSA, quando submetidas à triagem para verificação da resistência à oxacilina através do método descrito no item 3.2.

4.2. Análise por Eletroforese de campo pulsado (PFGE):

O perfil obtido da eletroforese de campo pulsado das cepas OSSA, neste trabalho, mostrou uma diversidade clonal entre os isolados provenientes de uma mesma unidade hospitalar. Exceção se fez notar entre os isolados C3 e C5, oriundos do hospital A, apresentando somente uma banda de diferença, e entre os isolados C31 e C33 oriundos dos Laboratórios L1 e L3, apresentando duas bandas diferentes. Estas exceções, portanto, poderiam estar relacionadas a um mesmo clone, segundo os critérios apresentados por TERNOVER et al (1995). As cepas C10 e C11 não tiveram seus perfis moleculares analisados devido a dificuldades de recuperação das mesmas.

Figura 3 - Fotografia do gel obtido da eletroforese de campo Pulsado (PGFE):

Figura 3a – Amostras C20 – C30:

Figura 3b – Amostras C1 – C19:

4.3. Determinação do tipo *agr*

Figura – 4: Fragmentos obtidos com a amplificação dos tipos de *agr* I, II e III

Tabela 7
estudada

<i>agr</i>	Cepas OSSA	Total (%)
I	C2,C8,C10,C13,C25,C36,C29	7 (19)
II	C9,C11,C14,C24,C28,C37,C30	7 (19)
III	C1,C3,C4,C5,C6,C7,C12,C15,C16,C17,C18,C19,C20,C21,C22,C23,C26,C27,C31,C32,C33,C34,C35	23 (62)

As siglas e o n°. que acompanham cada isolado são apenas códigos de identificação dos mesmos

Os valores percentuais encontram-se entre parênteses;

OSSA(Oxacillin Sensitive *Staphylococcus aureus*);

Tabela 8 - Fonte dos isolados em função do tipo de *agr* encontrado

Fonte de Isolamento n=37	<i>agr</i>		
	I (%)	II (%)	III (%)
Al	1(14)	1(14)	5(72)
Mat Clínico	6(20)	6(20)	18(60)

n - corresponde ao n°. de cepas relacionadas a cada item;

os valores percentuais encontram-se entre parênteses;

Mat. Clínico: Cepas provenientes de material clínico;

Al: cepas provenientes de alimentos envolvidos com quadros de toxi-infecção alimentar

4.4. Determinação dos genes codificadores dos fatores de virulência:

Figura – 5: Fragmentos obtidos com a amplificação de alguns dos fatores de virulência estudados

Figura – 5-a: Fragmentos amplificados dos Genes *hla*, *hlb*, *hlg*, *lukED* e *pvl*

Figura – 5-b: Fragmentos amplificados dos Genes *sea*, *seb*, *sed*, e *etb*

4.4.1 Tabela 9 - Genes codificadores de toxinas em função do tipo *agr* encontrado

Toxinas (n=37)	<i>agr</i>		
	I (%)	II (%)	III (%)
<i>sea</i>	0	0	15 (100)
<i>seb</i>	1 (14)	1 (14)	5 (72)
<i>sec</i>	0	1 (9)	11 (91)
<i>sed</i>	0	1 (50)	1 (50)
<i>see</i>	0	0	0
<i>tst</i>	1 (11)	2 (22)	6 (67)
<i>eta</i>	0	0	0
<i>etb</i>	0	0	0
<i>pvl</i>	1 (14)	1 (14)	5 (72)
<i>lukED</i>	6 (17)	7 (20)	22 (63)
<i>hla</i>	7 (18)	7 (18)	23 (64)
<i>hlb</i>	5 (17)	4 (13)	20 (70)
<i>hlg</i>	7 (19)	7 (19)	22 (62)

n corresponde ao nº. de isolados relacionados a cada item; os valores percentuais encontram-se entre parênteses;

4.4.2 Tabela 10 - Frequência dos genes codificadores de toxinas nos 37 isolados OSSA:

Genes codificadores de exotoxinas	Frequência (%)
<i>sea</i>	40
<i>seb</i>	19
<i>sec</i>	34
<i>sed</i>	5
<i>see</i>	0
<i>tst</i>	25
<i>eta</i>	0
<i>etb</i>	0
<i>pvl</i>	19
<i>luKED</i>	94
<i>hla</i>	100
<i>hlb</i>	78
<i>hlg</i>	97

4.4.3 Tabela 11 - Relação dos Genes de toxinas encontrados em função da origem das cepas estudadas

Genes codificadores de exotoxinas n=37	Alimentos n=7	Mat. Clínico n=30
<i>sea</i>	4 (57)	11 (37)
<i>seb</i>	0	7 (23)
<i>sec</i>	3 (43)	9 (30)
<i>sed</i>	0	2 (6)
<i>see</i>	0	0
<i>tst</i>	2 (28)	5 (16)
<i>eta</i>	0	0
<i>etb</i>	0	0
<i>pvl</i>	1 (14)	6 (20)
<i>luKED</i>	7 (100)	18 (60)
<i>hla</i>	7 (100)	30 (100)
<i>hlb</i>	6 (86)	23 (77)
<i>hlg</i>	7 (100)	29 (97)

n corresponde ao nº. de cepas relacionadas a cada item;
Os valores percentuais encontram-se entre parênteses

5. *Discussão*

Os patógenos microbianos têm uma ótima versatilidade em colonizar diversos nichos ecológicos e causar infecções em diferentes sítios anatômicos de seus hospedeiros. O processo molecular responsável pela doença em hospedeiros específicos é pouco conhecido. Todavia, grande importância, neste contexto, é atribuída à variação genética entre as cepas (FITZGERALD, et al.; 2001).

O *Staphylococcus aureus* podem ser comensais, como também patógenos extremamente versáteis em humanos. A doença causada por esta bactéria pode ser o resultado da invasão tissular direta ou devido à ação de uma variedade de exotoxinas liberadas. As cepas de *Staphylococcus aureus* patogênicas expressam vários fatores de virulência, os quais incluem tanto toxinas secretadas (exotoxinas), como também moléculas de superfície celular associadas com a adesão bacteriana. Pelo menos 34 diferentes proteínas extracelulares são produzidas por estas cepas, sendo que várias delas possuem um papel já definido na patogênese da doença estafilocócica (LISA, 2004). Com exceção da toxemia, as bases moleculares da patogenicidade do *Staphylococcus aureus* são multifatoriais, dependendo da presença e também da expressão de vários genes acessórios. Em processos invasivos, são vários os fatores de virulência que as cepas de *S. aureus* podem sintetizar, os quais incluem

polissacárides capsulares, proteínas associadas à superfície e várias exotoxinas (SUTRA et al., 1993).

Os métodos genético-moleculares são capazes de detectar o **potencial** das cepas produzirem a toxina em questão, pois existem casos em que genes de toxinas não são expressos. (Koleckova, et al., 2002). Portanto, os achados deste presente estudo fornecem-nos dados sobre os aspectos genéticos dos fatores de virulência intrínsecos nas cepas de *Staphylococcus aureus* estudadas. Analisamos, portanto, a presença de vários genes acessórios codificadores de exotoxinas e o tipo de seu gene regulador presente, no intuito de verificar a ocorrência de algum perfil de virulência prevalente nos tipos de *agr* encontrados, bem como no material de origem de cada cepa. Ademais, procurou-se confrontar os resultados obtidos por diversos autores com os resultados encontrados nesta pesquisa.

Para saber se os isolados analisados de cada centro não eram clonais, realizou-se a tipagem molecular destes isolados segundo a técnica da Eletroforese em gel de Campo Pulsado (PFGE). Segundo TERNOVER et al.(1995), a análise de tipagem molecular deve ser aplicada a isolados que estejam relacionados a pelo menos um dos itens: (i) a uma área específica na qual a infecção está ocorrendo,(ii) a um período comum a uma dada infecção, (iii) ou a uma fonte comum de uma infecção. Ademais, segundo este mesmo autor, estudos de tipagem molecular realizados sobre isolados os quais não apresentam nenhuma correlação epidemiológica podem conduzir a informações errôneas. Portanto, na tipagem molecular pela técnica de PFGE, os isolados OSSA, abordados neste trabalho, não foram analisados como um

conjunto único, uma vez que são provenientes de áreas não relacionadas. Desta feita, tal metodologia serviu para salientar a diversidade clonal entre os isolados de OSSA oriundos de localidades diferentes. O perfil obtido da eletroforese de campo pulsado das cepas OSSA neste trabalho mostrou baixa relação clonal entre as cepas provenientes de uma mesma unidade hospitalar. Exceção se fez notar entre os isolados C3 e C5, oriundos do hospital A, apresentando somente uma banda de diferença, e entre os isolados C31 e C33 oriundos do hospital N, apresentando duas bandas diferentes. Estas exceções, portanto, poderiam estar relacionadas a um mesmo sub-clone, segundo os critérios apresentados por TERNOVER et al (1995).

Segundo PEACKOC et al. (2002) o número de genes associados à virulência carregados por uma cepa bacteriana é um produto da interação entre as taxas de aquisição do gene, o custo para manutenção biológica e a taxa de falência da cepa causadora da doença. Como a vasta maioria das infecções graves por *Staphylococcus aureus* não pode ser explicada pela ação de somente um determinado fator de virulência, é imperativa a ação de vários destes fatores durante o processo infeccioso.

A sobrevivência e proliferação de um determinado patógeno dentro de um hospedeiro são favorecidas por mecanismos que permitem a evasão dos mecanismos de defesa do hospedeiro, bem como a colonização do microrganismo neste microambiente. Por conseguinte, cepas que escapam mais eficientemente dos mecanismos de defesa do hospedeiro serão os tipos mais prevalentes encontradas em tal microambiente.

A análise estatística de uma ampla base de dados de cepas patogênicas tem fornecido informações importantes em relação a genes ligados à virulência de um dado grupo prevalente destas cepas. Existem evidências de que alguns tipos clonais são mais virulentos que outros e que estes aparecem com uma frequência maior entre isolados de doentes do que em portadores sadios (MELLES et al., 2004).

Em trabalhos prévios, o estudo das exotoxinas estafilocócicas permitiu sua associação com algumas síndromes estafilocócicas específicas. Assim, verificou-se associações entre TSST-1 e a síndrome do choque tóxico estafilocócico (TODD et al., 1985), as epidermolisinas ETA e ETB com a SSSS (PIEMONT et al., 1988), a leucocidina de Panton-Valentine (PVL) com a ocorrência de furúnculos (PREVÓST et al., 1995) e a presença de cepas produtoras de SEA com diarreia estafilocócica pós-antibiótica (GRAVET et al., 1999). Também associou-se, em trabalhos prévios, o número de genes de exotoxinas com o potencial virulento de certas linhagens estafilocócicas. Assim, YAGI et al. (2004), estudando cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas de pacientes com dermatite atópica, ao examinar os genes de toxinas das cepas isoladas de sítios anatômicos diferentes destes pacientes, observou que a maior parte das cepas produtoras de toxinas (SEA-SED, TSST-1, ETA e ETB) correspondia às cepas provenientes da área de lesões exsudativas (75,4%). Todavia, observou que somente 40,7% das cepas isoladas das áreas sem lesões, eram produtoras das referidas exotoxinas.

A habilidade de cepas de *S. aureus* em evadir-se do sistema de defesa do hospedeiro é relatada, pelo menos em parte, à capacidade de produção de enterotoxinas (LE LOIR et al., 2003). As cepas produtoras de enterotoxinas podem ser isoladas de diversos materiais, sejam eles clínicos ou não. A literatura mostra resultados muito variáveis com relação à ocorrência de cepas enterotoxigênicas de *Staphylococcus aureus* isolados tanto de amostras clínicas quanto de alimentos (ROSEC et al., 1997; GRAVET et al., 2001). Isto é provavelmente devido a diferenças entre os tipos de materiais examinados, número de amostras, métodos de detecção utilizados, bem como a origem geográfica da cepa. Entre as cepas de *S. aureus* isoladas de alimentos, o percentual de cepas enterotoxigênicas é estimado em cerca de 25%. Porém tais estimativas variam em função do tipo do alimento e local do estudo (LE LOIR et al.; 2000). Na França, entre 61 cepas isoladas de alimentos, 15,9% foram enterotoxigênicas (ROSEC et al.; 1997). Na República Eslováquia, de 51 cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas de alimentos, 39,2% foram positivos para enterotoxinas (SEA - 5,9%; SEB - 23,5%; SEA e SEB - 9,8%).

Além da ação enterotoxigênica, as enterotoxinas de *S. aureus* também foram associadas a outras manifestações clínicas. Neste sentido, GRAVET et al. (2001) observaram que SEB foi produzida em 52% dos isolados de pacientes com impetigo e em 32% dos isolados de pacientes com furúnculos. MULLARY (2001), estudando 255 cepas de *S. aureus* isoladas de mastite bovina, concluiu que o genótipo mais comum de *S. aureus* encontrado era do tipo contra o qual os neutrófilos e, sobretudo, os mecanismos de defesa do hospedeiro mostravam-se menos eficientes. Isto sugere que os tipos encontrados em alta prevalência possuam características únicas que os

auxiliam na evasão do sistema imune do hospedeiro, uma vez que existem dados que confirmam a atividade de enterotoxinas de *S. aureus* na proteção contra apoptose mediada por neutrófilos (MOULDING et al., 1999). Porém, existem portadores de cepas de *S. aureus* carreadoras de genes para enterotoxinas, que não apresentam nenhuma manifestação clínica. Em um estudo espanhol, analisou-se 269 isolados coletados da microbiota nasal de portadores saudáveis e de alimentos, obtendo-se positividade para enterotoxinas em 23,9% das cepas provenientes de portadores e 26% das cepas provenientes de alimentos. (LE LOIR et al.; 2003). Além disto, a frequência do tipo de enterotoxina encontrada é variável, existindo, porém, um predomínio de algumas delas. A literatura mostra que a SEA é o tipo de enterotoxina mais encontrada em surtos de intoxicação alimentar estafilocócica. LE LOIR et al. (2003), analisando-se 269 isolados coletados da microbiota nasal de portadores saudáveis e de alimentos, encontrou que SEA e SEC foram as mais frequentes nas amostras analisadas (9.7% para ambas), sendo que a menos frequente foi a SEB (3%). Este autor, também concluiu que SEA e SEC relacionavam-se a organismos isolados de surtos de intoxicação alimentar estafilocócica. Este dado é importante uma vez que existe evidência de transmissão de portadores de tais cepas para os alimentos. MULLARY (2001), estudando 255 cepas de *S. aureus* isoladas de mastite bovina, achou que, dentre os isolados positivos para SEs, 62,4% eram positivos para SEA, 5,4% para SEC, 3,2% para SEB e 3,2 % para SED. YAGUI et al.(2004) observaram que, do universo de 81 pacientes estudados com dermatite atópica, 44% eram positivos para SEB, 27,2% para SEA, 27,2% para SEC e 4% para SED. Neste estudo, o gene de exotoxina mais detectado correspondeu ao *seb*. Por outro lado SEB é sugerida ser o mediador a induzir a lesão da dermatite atópica como

superantígeno, por estes autores, embora estes também mencionem a importância da presença das ETs em tal manifestação clínica. Observa-se, desta forma, que a frequência de determinados tipos de enterotoxina é dependente do quadro clínico do hospedeiro.

No atual trabalho, verificou-se que 54,1% das cepas analisadas foram positivas para pelo menos, um gene de enterotoxina. Para as amostras provenientes de alimentos relacionados a quadros de intoxicação alimentar (n=7), 100% das cepas analisadas foi positivo para, pelo menos, um gene de enterotoxina, servindo como controle positivo, uma vez que a sua expressão já havia sido previamente identificada por testes fenotípicos, como a hemaglutinação indireta, para a determinação das enterotoxinas.

Linhagens de *S. aureus* carreadores de genes codificadores de enterotoxinas também são encontradas em animais, conforme recentes trabalhos (CARDOSO et al., 1999; LARSEN et al., 2000 ; AKINEDEN et al., 2001). Em um estudo realizado em Minas Gerais, Brasil, encontrou-se um valor de 43% de positividade para enterotoxinas (SEA - SEE) em cepas de *S. aureus* isoladas de mastite bovina (CARDOSO et al.; 1999). Já na Dinamarca, das 414 cepas de *Staphylococcus aureus* isolados de mastite bovina, somente uma carregava gene para SEs (LARSEN et al.;2000). Na Alemanha, dos isolados de *S. aureus* oriundos de mastite bovina, 72,8% apresentaram-se enterotoxigênicas (SEA -SEJ)(AKINEDEN et al., 2001).

No presente trabalho foi constatado que o gene de enterotoxina mais freqüente, nos 37 isolados analisados, foi o gene *sea* (40,5%), seguido por *sec* (34,3%), *seb* (18,9%) e *sed* (5,5%). Por outro lado o gene *see* não foi detectado em nenhuma cepa. Com relação aos materiais analisados, o maior universo foi representado por isolados de infecções da corrente sanguínea e de alimentos. Apesar da presença da toxina SEB em alimentos contaminados por enterotoxinas estafilocócicas ser ressaltada por YAGUI et al., 2004, no presente trabalho nenhuma amostra de *S.aureus* isolada de alimentos apresentou o gene *seb*. Com relação à associação dos genes de enterotoxinas e o tipo de seu regulador *agr*, houve 100% de associação entre a presença de gene *sea* e o *agr* de tipo III. Dentre todas as cepas portadoras de um dos genes de enterotoxinas estudados, somente uma cepa, a qual foi positiva para *seb*, foi enquadrada dentro do tipo *agr*I. Desta forma, conclui-se que as cepas que apresentam genes para enterotoxinas enquadraram-se, preferencialmente, dentro dos tipos de *agr* II e III, revelando uma característica que pode ser inerente a determinados países, uma vez que JARROUD et al. (2001) observaram que as cepas causadoras de doenças mediadas por enterotoxinas, na França, pertenciam, principalmente, aos grupos *agr* I e II.

O gene *tst* codifica a produção de TSST-1, a qual é uma das exoproteínas estafilocócicas responsáveis pela TSS. A TSST-1 é produzida em torno de 100% das cepas de *S. aureus* isolados de mucosa cervical ou vaginal de mulheres que apresentaram TSS, e em aproximadamente 50% dos isolados de outros sítios corpóreos de pacientes com TSS não-menstrual. Por razões que não são totalmente conhecidas, certos segmentos de DNA codificadores de SAGs estafilocócicos não

coexistem na mesma cepa. Por exemplo, SEB e TSST-1 são raramente produzidos pelo mesmo isolado clínico. Especula-se, como explicação para tal fato, que em cepas portando determinados segmentos genéticos (Ex. SaPI1), a região de adição para uma segunda ilha de patogenicidade (ex. SaPI2 ou 3) é modificada de tal forma a prevenir a integração da mesma no cromossoma. Investigações adicionais deverão elucidar os mecanismos pelos quais estes elementos genéticos podem excluir a integração destes elementos “competidores” (MCCORMICK et al, 2001).

Dos isolados analisados no presente trabalho, 25 % foram positivas para *tst*. Nos isolados provenientes tanto do líquido pleural quanto do líquido cefalorraquidiano, todos apresentaram o gene *tst*. Os isolados portadores do gene *tst*, em sua maioria (66,7%), foram classificadas como *agr* tipo III, sendo que somente uma pertenceu ao *agr* tipo I.

Isolados portadores do gene *tst* podem ser encontrados tanto no ambiente hospitalar quanto na comunidade. Deuremberg et al. (2005) encontraram 24% dos 51 *Staphylococcus aureus* comunitários positivos para o gene *tst*, enquanto 14% das 36 cepas de *S. aureus* hospitalares foram positivas para *tst*. Por outro lado, estes autores constataram a presença de *tst* em 25% dos isolados de *S. aureus* oriundos de pacientes acometido com *Granulomatose de Wegener*, uma doença na qual o paciente é debilitado pela inflamação dos vasos sanguíneos, estipulando uma relação entre esta doença e a presença de tais cepas. YAGUI et al. (2004) observaram que 16,0% do universo de 81 pacientes estudados com dermatite atópica eram positivos

para TSST-1. JARROUD et al. (2001), relataram que, em seu universo de estudo, o gene *tst* não foi encontrado na mesma cepa portadora de *LukE-LukD*.

Cepas portadoras de gene *tst* foram encontradas também em animais, como relatado por MULLARY (2001), estudando 255 cepas de *S. aureus* isoladas de mastite bovina, onde 4,3 % destas cepas portavam o gene para *tst*.

As cepas de *Staphylococcus aureus* produzem duas classes de **toxinas bi-componentes**, compostas de duas proteínas de ações sinérgicas, secretadas independentemente, referidas como componentes de classe F e classe S. Foram caracterizados quatro *loci* codificando leucotoxinas bi-componentes em *S. aureus*: *pvl*, *hlg*, *LukE-LukD* e *lukM-LukF'-PV*. No presente trabalho, verificou-se a presença dos genes *pvl*, *hlg* e *lukE-lukD*, frequentemente citados na literatura, como representantes dos genes codificadores das toxinas bi-componentes. Dentre o conjunto de cepas analisadas, 97,3% foram portadoras do gene *hlg*, enquadrando-se dentro das estatísticas publicadas. Alta também foi a frequência observada para estas cepas em relação à presença do gene *lukE-lukD*, atingindo 96,15% destas cepas.

Com relação à presença do gene para *pvl*, a frequência encontrada foi de 19,4%. Esta frequência é baixa em relação a alguns trabalhos publicados (GRAVET et al., 2001; VON EIFF et al., 2004), os quais relatam a alta prevalência deste gene em cepas isoladas de pacientes com manifestações cutâneas, não se enquadrando em nosso grupo de estudo, por serem na sua maioria isolados de líquidos biológicos. Porém, tal prevalência é alta quando comparada à frequência estipulada de 2% para as cepas

clínicas que apresentam tal gene (PREVÓST et al., 1995). Deste modo, esta frequência relativamente alta do referido gene pode ser o reflexo de um alto potencial de virulência destas cepas. Das sete cepas que se apresentaram positivas para o gene *pvl*, cinco (71,4%) destas enquadraram-se dentro do tipo de agrIII, e as outras duas pertenceram aos tipos de agr I e II.

O freqüente isolamento de cepas de *Staphylococcus aureus* produtoras de leucotoxinas em pacientes com lesões epidérmicas necróticas, furúnculos e osteomielites, sugerem que estas toxinas desempenham um papel importante na virulência estafilocócica, pelo menos, no que concerne às infecções de pele e de tecidos (VON EIFF et al., 2004). Tal fato é evidenciado em isolados de *Staphylococcus aureus*, portadores do gene *pvl*, de pacientes imunocompetentes, os quais apresentavam um tipo de pneumonia hemorrágica necrotizante, altamente letal (GILLET et al., 2002).

O gene *pvl* é encontrado em torno de 2% das cepas clínicas, e é fortemente associado com a ocorrência de furúnculos, enquanto que os genes codificadores de gama hemolisinas são encontrados em torno de 99% dos isolados clínicos de *S. aureus* (PREVÓST et al., 1995). GRAVET et al. (2001) observaram que todas as cepas de *Staphylococcus aureus* isolados de furúnculos eram positivas para *pvl*. Ademais, isolados nasais de portadores deste gene podem servir como um reservatório endógeno para infecções clínicas disseminadas, podendo se espalhar para outros pacientes (VON EIFF et al., 2004). Consequentemente, uma estratégia

para se reduzir a infecção hospitalar por estas cepas seria sua erradicação nos portadores nasais encontrados (ARCHER et al., 2001).

A toxina LukE-LukD demonstrou ser altamente frequente (82%) entre os isolados sanguíneos de *Staphylococcus* (VON EIFF et al., 2004).

Já em cepas de *Staphylococcus aureus* isolados de pacientes com impetigo bolhoso, a associação desta manifestação clínica, com a presença leucotoxinas LukE-Luk-D foi demonstrado em 78% do casos estudados (GRAVET et al., 2001). GRAVET et al. (2001) em um estudo na Guiana, mostrou a associação entre cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas de furúnculos com a presença do gene *pvl*; o mesmo sendo relatado para isolados de *Staphylococcus aureus* na África (BABA et al., 1999).

Com relação às drásticas consequências biológicas secundárias aos danos em membranas celulares originados pelas leucocidinas, as quais contribuem direta ou indiretamente para a patogênese da doença aguda ou crônica, os dados sobre a epidemiologia molecular destas toxinas são, ainda, limitados e restritos, principalmente no que se refere às cepas de *Staphylococcus aureus* isolados no Brasil.

Há descrição de duas toxinas exfoliativas, sorologicamente distintas, designadas como **toxina exfoliativas A** e **toxina exfoliativas B** (ETA e ETB, respectivamente), cujos genes são designados como *etA* e *etB*. Cinco por cento dos isolados clínicos de *Staphylococcus aureus* produzem ETs (PIEMONT et al., 1984), sendo que há

relatos de diferenças geográficas na frequência da expressão destas toxinas (LISA, 2004). No presente trabalho não foi encontrado nenhum isolado portador dos genes *eta* e *etb*. Tal fato fundamenta-se pela forte associação das ETs com algumas síndromes específicas (SSSS e impetigo bolhoso), as quais não estavam dentro do universo do material clínico analisado. Outro fato importante foi não se encontrar nenhum tipo de *agr* IV nas cepas analisadas, tipo este fortemente relacionado com as ETs.

Na América do Norte, Europa e África, onde menos de 5% dos isolados clínicos de *Staphylococcus aureus* produzem ETs, a ETA é a predominante dentre as ETs (LADHANI, 2001). Em contraste, a ETB foi a mais comum relatada no Japão (KONDO et al., 1975). A frequência de genes para ETs em cepas isoladas de *Staphylococcus aureus* varia, conforme trabalhos publicados, segundo manifestações clínicas específicas. Em contrapartida, sabe-se que a incidência destas cepas em pacientes saudáveis é menos freqüente (ZOLLNER et al., 2000).

DANCER & NOBILE (1991) relataram que 3 % das cepas de *S. aureus* isoladas da cavidade nasal, axila ou períneo de mulheres grávidas eram portadoras de cepas produtoras de ETs. YAGUI et al. (2004), em pacientes portadores de dermatite atópica, observaram que 39,9% dos 81 pacientes estudados eram positivos para ETA, enquanto que 34,6% dos pacientes eram positivos para ETB. YAMASAKI et al. (2005) relataram que em 103 crianças com SSSS generalizada, as cepas de *S. aureus* isoladas apresentavam pelo menos um gene de *eta* ou *etb*; 30% eram infectadas com isolados que carreavam somente *eta*, 19% carreavam somente *etb* e 51% carreavam

ambos os genes. GRAVET et al. (2001), em um estudo na Guiana, mostrou que isolados de *Staphylococcus aureus* de pacientes com impetigo, produziam ETs em 86%.

Ademais, foi relatado uma forte associação entre as ETs com o tipo *agr* IV (JARRAUD et al., 2000).

No presente trabalho, além da Gama-hemolisina já descrita junto com as toxinas bi-componentes, verificou-se a presença das alfa e beta-hemolisinas. Estas hemolisinas são frequentemente encontradas nas cepas de *Staphylococcus aureus*. ARESTRUP et al. (1999), observaram que, das cepas de *Staphylococcus aureus* isolados de portadores sadios, 56% carregavam o gene para beta-hemolisina e naquelas isoladas de pacientes com bacteremia, 57% carregavam este gene. O gene para alfa hemolisina foi encontrado em todas as cepas analisadas.

Em nosso trabalho, 100% das cepas analisadas apresentaram o gene da alfa-hemolisina, consoante com trabalhos de ARESTRUP et al. (1999).

Para o gene codificador para beta-hemolisina, encontrou-se uma positividade de 78,4% nos isolados analisados, sendo que, especificamente, nos isolados de alimentos, encontrou-se uma alta positividade para este gene (85,7%).

Considerando-se as múltiplas formas e sítios das infecções estafilocócicas, é natural que estas bactérias sejam bem equipadas com sensores que lhes indiquem as

condições de seu microambiente e regulem a expressão dos fatores de virulência, possibilitando-as colonizar, dificultar as defesas imunológicas, multiplicar e dispersarem-se pelo organismo do hospedeiro (GRAVET et al.,2001). A expressão da maioria dos fatores de virulência em *Staphylococcus aureus* é controlada pelo locus *agr*, o qual codifica uma cascata regulada por dois componentes, cujo ligante ativador é um peptídeo sensor de densidade bacteriana (peptídeo auto-indutor), também codificado pelo *agr* (NOVICK et al.,2000). Baseando-se no polimorfismo da seqüência de aminoácidos do peptídeo auto-indutor e seu correspondente receptor (AgrC), pode-se dividir as cepas de *Staphylococcus aureus* em quatro grupos principais. Associações entre um tipo peculiar de *agr* e uma síndrome estafilocócica específica foi demonstrada para Síndrome do choque Tóxico (TST) e a Síndrome da Pele Escaldada (SSSS). Em trabalhos anteriores, observou-se que isolados produtores de TSST-1 enquadravam-se, principalmente, dentro do grupo *agr* III (JI et al.,1997). Cepas produtoras de esfoliatina, responsáveis por SSSS, pertenciam ao grupo *agr* IV (JARRAUD et al.; 2000). Em estudo de VAN LEEUWEN et al., 2000, abrangendo 192 cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas de portadores, observou-se a prevalência do grupo *agr* I, sendo que a maioria das quais foram resistentes a meticilina.

JARRAUD et al. (2001) observaram que as cepas causadoras de **doenças mediadas por enterotoxinas** pertenciam, principalmente, aos grupos ***agr* I e II e III**, e que a distribuição dos tipos *agr* nas cepas estudadas foram: I (43.6%), II (28.0%), III (24.7%) IV(3.3%). MOORE et al. (2001), estudando MSSA, acharam a seguinte prevalência dos tipos de *agr*: I (61%), II (26%) e III (13%) e relataram, também, a associação do

tipo de **agr III** com **tst**, não encontrando esta toxina juntamente com **seb** em uma mesma cepa.

Em nosso estudo, a maioria dos isolados OSSA analisados enquadraram-se dentro do **agr** de tipo III (62,2%). O restante ficou igualmente distribuído entre os tipos de **agr** I e II (18,9% cada). Observa-se, desta feita, que as cepas de *Staphylococcus aureus* sensíveis à oxacilina, isoladas no Brasil, utilizadas neste estudo, devido ao predomínio do tipo de **agr** III (62,2%), destoa-se de trabalhos publicados em outros países, como o predomínio do **agr** tipo I (43,6%), em cepas *Staphylococcus aureus*, observado na França(JARROUD et al.; 2001) e na Inglaterra (MOORE et al., 2001).

Com relação ao tipo de material clínico, os dois isolados provenientes de líquido pleural enquadraram-se dentro do tipo de **agr** I, enquanto que os dois isolados provenientes de líquido cefalorraquidiano enquadraram-se dentro do tipo de **agr** III. Este tipo de **agr** correspondeu a maioria dos isolados de hemoculturas(57,7%) e de alimentos (71,4%). Portanto, o **agr** tipo- III mostrou-se o mais freqüente entre os isolados provenientes dos diferentes materiais clínicos analisados, com exceção da observada nas cepas provenientes de líquido pleural.

Curiosamente, 100% das cepas portadoras do gene *sea* pertenceram ao tipo de **agr** III, chamando atenção especial para esta associação. A mesma relação de predomínio do tipo de **agr** III foi observado para os demais genes analisados: *pvl* (71,4%), *lukE-lukD* (62,9%), *hla* (62,8%), *hly* (68,9%), *hlg*(61,2%).

Consoante com MOORE et al. (2001), o gene *tst* pertenceu, em sua maioria, ao tipo de *agr* III(66,7%).

Verificou-se, portanto, que os *Staphylococcus aureus* podem usar combinações de diversos fatores de virulência, os quais podem resultar em uma síndrome clínica e possivelmente contribuir para a dispersão bacteriana no organismo do hospedeiro. Determinados genes acessórios, codificadores de exoproteínas, podem ser usados como marcadores potenciais de virulência para tais cepas, como é o caso dos genes *seb*, *sea*, *tst* e *pvl*, os quais foram encontrados com frequência relevante nestes estudos. Ademais o tipo de *agr* III pode ser considerado um potencial representante de cepas OSSA bem sucedidas no ambiente hospitalar e ou comunitário.

6. *Conclusões*

O presente trabalho mostrou que a frequência dos genes codificadores de exotoxinas dependeu de variações decorrentes de alguns fatores, como, por exemplo, natureza da fonte de isolamento da cepa e localização geográfica. O gene codificador de enterotoxina mais freqüentemente determinado foi *sea*, seguido por *sec*, e 100% das amostras portadoras do gene *sea* estavam relacionadas com *agr* de tipo III.

Observou-se resultados divergentes aos estudos realizados em outros países, como o encontro de isolados contendo genes codificadores de *seb* e *tst* (33%), correlação esta que a literatura pesquisada julgava não ser freqüente, o mesmo acontecendo para a presença simultânea de *tst* e *lukE-lukD*.

Não se encontrou isolados portadores de toxinas esfoliativas, tampouco genes com o *agr* de tipo IV, no universo estudado.

Apesar do baixo universo de isolados oriundos de LCR (n=2) e Líquido Pleural (n=2), observou-se que todos estes isolados foram positivos para *pvl*, indicando que, em infecções invasivas, é possível a participação das leucocidinas do tipo Panton-valentine. A frequência relativamente alta (14%) de isolados portadores deste gene encontradas neste trabalho parece ressaltar a participação da leucocidina PVL no incremento da virulência de tais isolados.

A maioria (62%) dos isolados analisados foram portadores do tipo de *agr* III, divergindo de resultados publicados em outros países que relatam um predomínio de *agr* I.

Conclui-se, portanto, que as bases moleculares da patogenicidade do *S. aureus* é multifatorial, dependendo não somente da presença, como também da expressão de vários genes acessórios. Desta feita, observa-se que as infecções graves desencadeadas por estas bactérias são o produto do somatório de vários fatores de virulência, codificados por tais genes. Neste contexto, torna-se de suma importância o conhecimento do perfil genotípico apresentado pelas cepas de *S. aureus* isoladas freqüentemente de determinada localidade, podendo-se, com isto não somente prever manifestações clínicas decorrentes de uma possível dispersão, como também encontrar mecanismos que auxiliem no controle das mesmas.

7. Referências Bibliográficas

AMAGAI, M.; YAMAGUCHI, T.; HANAKAWA, Y.; NISHIFUGI, K.; SUGAI, M.; STANLEY, J.R. Staphylococcal exfoliative toxin B specifically cleaves desmoglein 1. **J. Invest. Dermatol.** V. 118, p. 845-850, 2002.

AKINEDEN, °; ANEMULLER, C.; HASSAN, A.A.; LAMMLER, C.; WOLTER, W.; ZSCHOC, M. Toxin genes and others characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from milk of cows with mastitis. **Clin. Diagn. Lab. immunol.** v. 8, p. 959-964, 2001.

ARCHER, G.L. Staphylococcus aureus: a well-armed pathogen. **Clin Infect Dis.** v. 26, p. 1179-1181, 1998.

ARCHER, G.L.; CLIMO, M.W.; *Staphylococcus aureus* bacteremia – consider the source. **N Engl J Med.** V.344, p. 55-56, 2001.

ARESTRUP, F.M.; LARSEN, H.D.; ERIKSEN, N.H.; ELSBERG, C.S.; JENSEN, N.E. Frequency of alpha- and beta haemolisin in *Staphylococcus aureus* of bovine and human origin. A comparison between phenol- and genotype and variation in phenotypic expression. **APMIS.** V.107, p.425-430, 1999.

BALABAN, N.; GOLDKORN, T.; GOV, T.; HIRSHBERG, M.; KOYFMAN, N.; MATHEWS, H.R.; NHAN, R.T.; SINGH, B.; UZIEL, O. regulation of *Staphylococcus aureus* pathogenesis via target of RNA-III-activating protein (TRAP). **J Biol Chem.** v. 276, p. 2658-2667, 2001.

BERGDOLL, M.S.; CRASS, B.A.; REISER, R.F.; ROBBINS, N.R.; DAVIS, J.P. A new staphylococcal enterotoxin, enterotoxin F, associated with the Toxic Shock syndrome *Staphylococcus aureus* isolates. **Lancet j.** v.8228, 1017-1027, 1981.

BHAKDI, S.; TRANUM, J.J. Alpha-toxin of *Staphylococcus aureus*. **Microbiol.Review.** v. 55, p.733, 1991.

BHAKDI, S.; MUHLY, M.; MANNHARDT, U.; et al. Staphylococcal alpha-toxin promotes blood coagulation via attack on human platelets. **J Exp Med.** v.168, p.527, 1988.

BERGDOLL, M.S.; CRASS, B.A.; REISER, R.F. et al. A new staphylococcal enterotoxin, enterotoxin F, associated with Toxic Shock Syndrome *Staphylococcus aureus* isolates. **Lancet.** v.1, p1017, 1981.

BERNHEIMER, A.W.; RUDY, B.; Interactions between membranes and cytolytic peptides. **Biochim Biophys Acta.** v.864, p.123, 1986.

BETTLEY, M.J.; BORST, D.W.; REGASSA, L.B. Staphylococcal enterotoxins, toxic shock syndrome toxin and streptococcal pyrogenic exotoxins: A comparative study of their molecular biology. **Chem. Immunol.** v. 55, p. 1-35, 1992

BETLEY, M.J.; MEKALANOS, J.J. Staphylococcal enterotoxin A is encoded by phago. **Science.** v. 229, p. 185-187, 1985.

MOUSSA, B.L.; SANNI, A.; DAGNRA, A.Y.; ANAGONOU,S.; DAVID, M.P.; et al.; Approche épidémiologique de l'antibiorésistance et de la proction de leucotoxines par lès souches de *Staphylococcus aureus*isolées em Afrique de l'Ouest. **Med. Mal. Infect.** V. 29, p.689-696, 1999.

BOHACH, G.A.; FAST, D.J.; NELSON, R.D.;SCHLIEVERT, P.M. Staphylococcal and Streptococcal pirogenic toxins involved in toxic shock syndrome and related illnesses. **Crit Rev Microbiol.** v. 17,p. 251-272,1990

BOHACH, G.A.,; FOSTER, T.J. Gram-Positive Pathogens. **American Society for Microbiology.** p. 367-378, 2000.

BOHACH, G.A.; FAST, D.J. NELSON, RD.;SCHLIEVERT, P.M. Staphylococcal and Streptococcal pyrogenic toxins involved in toxic shock syndrome and related illnesses. **CRC Crit Rev Microbiol.** v.17, p.251, 1990.

BOYCE, J.M.; The staphylococci in human disease. **Epidemiology and prevention of nosocomial infections.** Churchill Livingstone, New York, N.Y.. p. 309-329, 1997.

BRMLEY, A.J.; PATEL, H.A.; REILLY, M.O. et al. Roles of alpha-toxin and beta-toxin in virulence of *Staphylococcus aureus* for the mouse mammary gland. **Infect Immun.** v. 57, p. 2489, 1989.

CALLEGAN M.C.; ENGEL, L.S.; HILL, J.M.; O'CALLAGHAN, R.J. Corneal virulence of *Staphylococcus aureus*: roles of alpha-toxin and protein A in pathogenesis. **Infect. Immun.** v.62, p.2478, 1994.

CARDOSO, H.F.; SILVA, N.; SENA, M.J.; CARMO, L.S. Production of enterotoxins and toxic shock syndrome toxin by *staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Brasil. **Lett. Appl. Microbiol.** v.29, p. 347-349.

COONEY, J.; KIENLE Z.; FOSTER, T.J., O'TOOLE, P.W. The gamma hemolysin locus of *Staphylococcus aureus* comprises three linked genes, two of which are identical to the genes form F and S components of leucocidin. **Infect Immun.** v.61, p.768, 1993.

CORKILL, E.J.; ANSON, J.J.; GRIFFTS, P.; HART, C.A. Detection of elements of the Staphylococcal cassette chromosome in a methicillin susceptible (*mec A* gene negative) homologue of a fucidin-resistant MRSA. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy.** v.54, p. 229-231, 2004.

DANCER S.J.; NOBLE, W.C. Nasal, axillary, and perineal carriage of *Staphylococcus aureus* among women: identification of strains producing epidermolytic toxin. **J. Clin. Pathol.** V.44, p.681-684, 1991.

DAY, N.P.J.; MOORE, C.E.; ENRIGHT, M.C.; BERENDT, A.R., SMITH, J.M.; MURPHY, M.F.; PEACOCK, S.J.; SPRATT, P.G.; FEIL, E.J. A link between virulence and ecological abundance in natural populations of *Staphylococcus aureus*. **Science.** v. 292, p. 114-116, 2001.

DEURENBERG, R.H.; NIEUWENMHUIS, R.F.; DRIESSEN, C.; LONDON, N.; STASSEN, F.R.; VAN TIEL, F.H.; et al. The prevalence of the *Staphylococcus aureus* *tst* gene among community- and hospital- acquired strains and isolates from Wegener's Granulomatosis patients. **FEMS Microbiol. Lett.** V.245, p. 185-189, 2005.

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

FiNK, D.; CONTRERAS, M.L.; LELKES, P.I.; LAZAROVICI, P. *Staphylococcus aureus* alpha-toxin activates phospholipases and induces a Ca^{2+} influx in PC12 cells. **Cell. Signal.** V.1(4), P. 387-393, 1989.

FTZGERALD, J.R.; MONDAY, S.R.; FOSTER, T.J.; BOLACH, G.^a; HARTIGAN, P.J.; et al. Characterization of putative pathogenicity island from bovine *Staphylococcus aureus* encoding multiple superantigens. **J. Bacteriol.** v.183, p63-70, 2001.

FITZGERALD, J.R.; STURDEVANT, E.D.; MACKIE, S.M.; GILL, S.R.; MUSSER, J.M. Evolutionary genomics of *Staphylococcus aureus*: Insights into the origin of methicillin-

resistant strains and the toxic shock syndrome epidemic. **PNAS**. V.98, p.8821-8826, 2001.

GEMMEL, C.G. Staphylococcal scalded skin syndrome. *J. Med. Microbiol.* V. 43, p. 318-327, 1995.

GILLET, Y.; ISSARTEL, B.; FOURNET, J.C.; LINA, G.; BES, M.; et al. association between *Staphylococcus aureus* strains carrying gene for Panton-Valentine leucocidin and highly lethal necrotizing pneumonia in young immunocompetent patients. **Lancet**. V.359, p. 753-759, 2002.

GOTTILIEB, G.S.; FOWLER, V.G.; KANG, L.K. *Staphylococcus* bacteraemia in the surgical patient: a prospective analysis of 73 postoperative patients who developed *Staphylococcus aureus* bacteraemia at a tertiary care facility. **J Am Coll Surg**. v. 190, p. 50-57, 2000.

GRAVET, A.; COLIN, D.A.; KELLER, D.; GIRADOT, R.; MONTEIL, H.; PREVÔST, G. Characterization of a novel structural member, LukE-LukD, of the bi-component staphylococcal leucotoxins family. **FEBS Lett**. V. 436, p. 202-208, 1998.

GRAVET, A.; RONDEAU, M.; MONTÉIL, C.H.; GRUNEMBERGER, F.; MONTEIL, H.; et al. Predominant *Staphylococcus aureus* isolated from antibiotic-associated diarrhea is clinically relevant and produces enterotoxin A and the bicomponent toxin LukE-LukD. **J. Clin. Microbiol.** V. 37, p. 4012-4019, 1999.

GRAVET, A.; COUPPIE, P.; MEUNIER, O.; et al.; *Staphylococcus aureus* isolated in cases of impetigo produces both epidermolysin A or B and LukE-LukD in 78% of 131 retrospective and prospective cases. **J. Clin. Microbiol.** V. 39, p. 4349-4356, 2001.

HARRIS, T.O.; BETLEY, M.J.; Biological activities of staphylococcal enterotoxin type A mutants with N-terminal substitutions. **Infect Immun**. v.63, p.2133, 1995.

HARRIS, T.O.; GROSSMAN, D.; KAPPLER, J. W.; MARRACK, P.; RICK, R.R.; BETLEY, M.J.; et al.; Lack of complete correlation emetic and T-cell-stimulatory activities of staphylococcal enterotoxins. **Infect. Immun**. v. 61, p. 3175-3183, 1993.

HELALI, N.E.; CARBONNE, A.; NAAS, T.; KERNEIS, S.; FRESCO, O.; GIOVANGRANDI, Y.; et al. Nosocomial outbreak of staphylococcal scalded skin syndrome in neonates: Epidemiological, investigation and control. **J. Hosp. Infect.** V. 20, p.1-9, 2005.

HERNANDEZ, F.J.; GOYACHE, J.; ORDEM, J.A.; BLANCO, J.L.; DOMENECH, A.; SUAREZ, G. et al. Repair and enterotoxin synthesis by *Staphylococcus aureus* after thermal shock. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 59, p. 1515-1519, 1993.

HERZER, C.M. Toxic shock syndrome: Broadening the differential diagnosis. **J. Am Board Fam Pract.** V. 14, p. 131-136, 2001.

HOLEKOVA, B.; HOLODA, E.; FOTTA, M.; KALINASKOVA, V.; GONDOL, J.; GROLMUS, J. Occurrence of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in food. **Ann Agric Environ. Med.** v.9 p. 179-182, 2002.

HOLMBERG, S.D.; BLAKE P.A. Staphylococcal food poisoning in the United States. New facts and old misconceptions. **JAMA.** v.251, p.487, 1984.

JARRAUD, S.; LYON, G. J.; FIGUEIREDO, A.M.; LINA, G.; VANDENESCH, F.; ETIENE, J.; MUIR, T.W.; NOVICK, R.P. Exfoliatin-producing strains define a fourth *agr* specificity group in *Staphylococcus aureus*. **J. Bacteriol.** v.182, p.6517-6522, 2000.

JARRAUD, S.; PEYRAT, M.A.; LIM, A.; TRISTAN, A.; BES, M.; et al. A high prevalent operon of enterotoxin gene, forms a putative nursery of superantigens in *Staphylococcus aureus*. **J. Immun.** v. 166, p. 669-677, 2001.

Jarraud, S.; Mougél, C.; Thioulouse, J.; Lina G.,¹ Meugnier, H.; Forey F.; Nesme X.; Etienne, J.; Vandenesch, F. Relationships between *Staphylococcus aureus* Genetic Background, Virulence Factors, *agr* Groups (Alleles), and Human Disease. **Infect Immun.** v.70, p.631–641, 2002.

JI, G.; BEAVIS, R.; NOVICK, R.P.; Bacterial interference caused by autoinducing peptide variants. **Science.** v.276, p.2027-2030, 1930.

JONAS, D.; WALEV, I.; BERGER, T. et al. Novel path to apoptosis: small transmembrane pores created by staphylococcal alpha-toxin in T lymphocytes evoke internucleosomal DNA degradation. **Infect Immun.** v. 62, p.1304, 1994.

KANZAKI, H.; UEDA, M.; MORISHITA, Y.; AKIJAMA, H.; ARATA, A.; KANZAKI, S. Producibility of exfoliative toxin and *Staphylococcus* coagulase types of *Staphylococcus aureus* strains isolated from skin infections and atopic dermatitis. **Dermatol.**, V.195, p. 6-9, 1997.

KAPER, J.B.; KACKER, J. Pathogenicity islands and other mobile virulence elements. **ASM Press.** Washington, DC, 1999.

KONDO, I.; SAKURAI, S.; SARAI, Y.; FUTAKI, S. Two serotypes of exfoliatin and their distribution in staphylococcal strains isolated from patients with scalded skin syndrome. **J. Clin. Microbiol.** V.1, p. 397- 400, 1975.

LADHANI, S.; JONNOU, C.L.; LOCHRIE D.P.; EVANS, R.W.; POSTON, S.M. Clinical, microbial and biochemical aspects of the exfoliative toxins causing Staphylococcal scalded Skin Syndrome. **Clin. Microbiol. Rev.** v.12, p.224-242, 1999.

LADHANI, S. Recent developments in staphylococcal scalded skin syndrome. **Clin. Microbiol. Infect.** v.7, p. 301-307, 2001.

LAN, R.; REEVES, P.R. Intraspecies variation in bacterial genomes: the need for a species genome concept. **Trends Microbiol.** v. 8, p. 396-401, 2000.

LARSEN, H.D.; HUDA, A.; ERIKSEN, N.H.R.; JENSEN, N.E. Differences between Danish bovine and human *Staphylococcus aureus* isolates in possession of superantigens. **Vet. Microbiol.** v. 76, p. 153-162, 2000.

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

LEE, C.Y.; SCHIMIDT, J.J, WINEGAR, J.A.D. et al. Sequence determination of the exfoliative toxin a and toxin b genes from *Staphylococcus aureus*. **J Bacteriol.** v.169, p.3904, 1987.

LINDSAY, J.A.; RUZIN, A.; ROSS, H.F.; KUREPINA, N.; NOVICK, N.P. The gene for toxic shock toxin is carried by a family of mobile pathogenicity islands in *Staphylococcus aureus*. **Mol. microbiol.** v.29, p. 527-543, 1998.

LISA, R.W. *Staphylococcus aureus* exfoliative toxins: How they cause disease. **Derm. Foundat.** V.122, p. 1070-1077, 2004.

MACKENZIE, A.; JOHNSON, W.B.H.; NORRISH, B. JAMIESON, F. A prolonged outbreak of exfoliative toxin A-producing *Staphylococcus aureus* in a Newborn Nursery. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.** V. 21, p.69-75, 1995.

MARR, J.C.; LYON, J.D.; ROBERSOM, J.R. et al. Characterization of novel type c staphylococcal enterotoxins: Biological and evolutionary implications. **Infect Immun.** v.61, p.4254, 1993.

MAYVILLE, P.; JI, G.; BEAVIS, R.; YANG, H.; GOGGER, M.; NOVICK, R.P.; MUIR, T.W. Structure-activity analysis of synthetic autoinducing thiolactone peptides from *Staphylococcus aureus* responsible for virulence. **Proc. Natl Acad Sci USA** v.96, p.1218-1223, 1999.

MARRACK, P.; KAPPLER, J. The *Staphylococcus* enterotoxins and their relatives. **Science.** p. 248-705, 1990.

McCORMICK, J.K; YARWOOD, J.M; SCHLIEVERT, P.M. Toxic shock syndrome and bacterial superantigens: an update. **Annu. Ver. Microbiol.** v.55, p. 77-104, 2001.

MELLES, D. C.; GORKINK, R. F.; BOELEN, H.A.; SNIJDERS, S.V., PEETERS J. K.; MOORHOUSE, M.J.; VAN DER SPEK, P. J.; VAN LEEUWEN, W.B.; SIMONS, G.; VERBRUGH, H.A.; VAN BELKUM, A. Natural population dynamics and expansion of pathogenic clones of *Staphylococcus aureus*. **J. Clin Invest.** v. 114, p.1732-1740, 2004

MELZER, M.; EYKYN, S.J.; GRANSDEN, W.R.; CHINN S. Is methicilin-resistant *Staphylococcus aureus* more virulent than methicilin-susceptible *S. aureus*? A comparative cohort study of British patients with nosocomial infection and bacteremia. **Clin Infect Dis.** v. 37, p. 1453-1460, 2003.

MOULDING, D. A.; WATER, C.; HART, C.A.; EDWARDS, S. W. Effects of Staphylococcal enterotoxins on human neutrophil functions and apoptosis. **Infect. immun.** v.67, p. 2312-2318, 1999.

MOORE, P.C.L.; LINDSAY, J.A. Genetic variation among hospital isolates of methicilin-sensitive *Staphylococcus aureus*: evidence for horizontal transfer of virulence genes. **J Clinl Microbiol.** v. 39, p.2760-2767, 2001

MUNSON, S.H.; TREMAINE, L.T.; BETLEY, M.J.; WELK, R.A. Identification and characterization of staphylococcal enterotoxin types G and I from *Staphylococcus aureus*. **Infect. Immun.** v.66, p. 3337-3348, 1998.

MULLARY, I.K.; SU, C.; FRIEZE, N.; PARK, Y.H.; SORDILLO, L.M. *Staphylococcus aureus agr* genotypes with enterotoxin production capabilities can resist neutrophil bactericidal activity. v. 69, p.45-51, 2001

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORIAL STANDARDS (NCCLS). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility testing. M100-S11. v. 21, 2003.

NOVICK, R.P. Patogenicity factors and their regulation. In Fischetti, V. A.; Novick, R. P.; Ferretti, J.J.; Portnoy, D.A.; Rood, J.J. Gram-positive pathogens. **ASM, Washington DC.** p 392-407, 2000.

NOVICK, R.P. Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. **Mol. Microbiol.** V. 48, p. 1429- 1449, 2003.

PARRILO, J.E.: Pathogenetic mechanisms of septic shock. **N. Engl J. M.** v.329, p.1427, 1993

PENG, H.L.; NOVICK, R.P.; KREISWIRTH, B. et. al. Cloning, characterization, and sequence of an accessory gene regulator (*agr*) in *Staphylococcus aureus*. **J Bacteriol.** v.170, p.4168, 1994.

PIEMONT, Y.; RIFAI, S.; MONTÉIL, H. Les esfoliatines de *Staphylococcus aureus*. **Bull. Inst.** V. 86, p. 263-296, 1988.

PLOMET, M. Preparation and purification of gamma-hemolysin of staphylococci. **Methods Enzymol.** v.165, p.8, 1988.

PREVOST, G.; JAULHAC B. ; PIEMONT, Y. DNA fingerprinting by pulsed-field gel electrophoresis is more effective than ribotyping in distinguishing among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates. **J Clin Microbiol.** V. 30(4)p.967-973, 1992.

PREVOST, G.; COUPPIE, P.; PREVOST, P.; GAYET, S.; PETIAU, P. et al. Epidemiological data on *Staphylococcus aureus* strains producing synergohymenotropic toxins. **J Med Microbiol.** v.42 p.237, 1995.

PREVOST, G.; CRIBIER, B.; CUPPIE, P. PETIAU, P.; SUPERSAC, G.; et al. Pantovale leucocidina e gamma-hemolysin from *Staphylococcus aureus* ATCC 49775 are encoded by distinct genetic loci and have different biological activities. **Infect Immun.** v.63, p.4121, 1995.

PROJAN, S.J.; KORNBLUM, J.; KREISWIRTH, B. et al. Nucleotide sequence: The beta-hemolysin gene of *Staphylococcus aureus*. **Nucleic Acids Res.** v.17, p.3305, 1989.

RECSEI, P.; KREISWIRTH, B.; O'REILLY, M. et al. regulation of exoprotein gene expression by *agr*. **Mol Gen Genet.** v.202, p.598, 1986.

REINGOLD, A.L.; HARGRETT, N.T., DAN, B.B. et al. Non-menstrual Toxic Shock syndrome: A review of 130 cases. **Ann Intern Med.** v.196, p.871, 1982.
RUZICKOVA, V. A rapid method for the differentiation of *Staphylococcus aureus* hemolysins. **Folia Microbiol.** v.39, p.242-308, 1972.

ROSEC, J.P.; GUIRAUD, J.P.; DALET, C.; RICHARD, N. Enterotoxin production by staphylococci isolated from foods in France. **Int. j. food Microbiol.** v. 35, p. 213-221, 1997.

SAKO, T.; TSUCHIDA, N. Nucleotide sequence of the staphylokinase gene from *Staphylococcus aureus*. **Nucleic Acids Res.** vol.11, p.7679, 1983.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: A laboratory manual, 2nd ed. **Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.**, 1989.

SATO, H.; MATSUMI, Y.; TANABE, T.; SAITO, H.; SHIMIKU, A.; KAWANO, J. A new type of staphylococcal exfoliative toxin from *Staphylococcus aureus* strains isolated from a horse with phlegmon. **Infect. Immun.** V. 62, p-3780-3785, 1994.

SCHLIEVERT, P.M.; SHANDS, K.N.; DAN, B.B. et al. Identification and characterization of an exotoxin from *Staphylococcus aureus* associated with Toxic Shock Syndrome. **J Infect Dis** v.143, p.509, 1981.

SCHLIVERT, P.M.; JABLONSKI, L.M.; ROGGIANI, M.; SADLER, I.; CALLANTINE, S.; et al.; Pirogenic toxin superantigen site specificity in toxic shock syndrome and food poisoning in animals. **Infect. immun.** v. 68, p. 3630-3634, 2000.

SOMERVILLE, G.A.; STEPHEN, B.B.; FITZGERLD, J.R.; DELEO, F.R.; COLE, R.L.; HOLF, J.S.; MUSSER, J.M. In vitro serial passage of *Staphylococcus aureus*: changes in physiology, virulence factor production, and *agr* nucleotide sequence. **J Bacteriol.** v. 184, p. 1430-1437, 2002.

Struelens, M. J.; Deplano, A.; Godard, C.; Maes, N.; Serruys, E. Epidemiologic typing and delineation of genetic relatedness of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by macrorestriction analysis of genomic DNA by using pulsed-field gel electrophoresis. **J Clin Microbiol.** v. 30, p. 2599–2605, 1992.

SUTRA, L.; POUTEREL, B. virulence factors involved in the patogênese of bovine intramammary infections due to *S. aureus*. **J. Med. Microbiol.** v.40, p 79-89, 1993.

SUTTORP, N.; SEEGER, W.; DEWEIN, E.; et al. Staphylococcal alpha-toxin stimulates synthesis of prostacyclin by cultured endothelial from pig pulmonary arteries. **Am J Physiol.** v.248, p.127, 1985

TENOVER, F.C.; ARBEIT, R.D.; GOERING, R.V.; MICKELSEN, P.A.; MURRAY, B.E.; PERSING, D.H.; SWAMINATHAN, B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel eletroforesis: criteria for bacterial strains typing. **J. Clin. Microbiol.** v 33, p. 2233-2239, 1995.

TODD, J.; FISHAUT, M.; KAPRAL, F.; WELCH, T. Toxic Shock syndrome associated with phage- group-I staphylococci. **Lancet.** v.2, p.1116, 1978.

TODD, J.K. Staphylococcal toxin syndromes. **Annu. Rev. Med.** V. 36, p. 337-347, 1985.

TREMAINE, M.T.; BROCKMAN, D.K.; BETLEY, M.J. Staphylococcal enterotoxin A gene (*sea*) expression is not affected by the accessory gene regulator (*agr*). **Infect. Immun.** v. 61, p. 356-359, 1993.

VAN LEUWEN, W.; VAN NIEUWENHUIZEN, C. G.; VERBRUG, H. VAN BELKUN, A. Population studies of methicillin-resistant and sensitive *Staphylococcus aureus* reveal a lack of variability in the *agrD* gene, encoding a Staphylococcal autoinducer peptide. **J. Bacteriol.** v.182, p.5721-5729, 2000.

VATH, G.M.; EARTHART, C.A.; MONIE, D.D.; LANDOLO, J.J.; SCHLIEVERT, P.M.; et al. The crystal structure of exfoliative toxin B: a superantigen with enzymatic activity, *Biochemistry*, v, 38, p.10239-10246, 1999.

VICENT, J.L.; BIHARI D.J.; SUTER, P.M.; BRUINIG, H.A.; WHITE, J.; WOLF, M.; SPENCER, R.C.; HEMMER, M. The prevalence of nosocomial infection in intensive care units in Europe. **Results of the European Prevalence of Infection in Intensive care (EPIC) Study. EPIC International Advisory Committee. JAMA.** v. 274, p. 639-644, 1995.

YAGUI, S.; WALAKI, N.; IKEDA, N.; TAGAGI, Y.; UCHIDA, H.; KATO, Y.; MINAMINO, M. Presence of staphylococcal exfoliative toxin A in sera of patients with atopic dermatitis. **Clin. Exp. Allerg.** V. 34, p.984-993, 2004

YAMAGUCHI, T.; HAYACHI, T.; TAKAMI, H.; NAKASOME, K.; OHNISHI, M.; NAKAYAMA, K.; YAMADA, S.; KOMATSUZAWA, H.; SUGAI, M. Phage conversion of exfoliative toxin A production in *Staphylococcus aureus*. **Mol Microbiol.** v. 38, p.694-705, 2000.

YAMAGUCHI, T. NISHIFUGI, K.; SASAKI, M. et al. Identification of the *Staphylococcus aureus* exfoliative toxin A pathogenicity island which encodes a novel exfoliative toxin, ETD, and EDIN-B. **Infect. Immun.** V.70, p. 5835-5845, 2002.

YAMAZAKI, O.; YAMAGUCHI, T.; SUGAI, M.; CELLIER, C.C.; ARNAUD, F.; VANDENSCH, F.; et al. Clinical manifestations of staphylococcal scalded skin syndrome depend on serotypes of exfoliative toxins. *J. Clin. Microbiol.* V.43, p.1890-1893, 2005.

YOSHIZAWA, Y.; SAKURADA, J.; SAKURAI, S.; MACHIDA, K.; KONDO, I.; MASUDA, S. An exfoliative toxin A-converting phage isolated from *Staphylococcus aureus* strain ZM. **Microbiol Immunol.** v.44, p.189-191, 2000.

WADSTROM, T. MOLLBY, R. Studies on extracellular proteins from *Staphylococcus aureus*. **Biochim Biophys Acta.** v.242, p.308, 1972.

WERNWE, S.; COLIN, D.A.; CORRAIOLA, M.; MENESTRINA, G.; MONTEIL, H.; PRÉVOST, G. Retrieving biological activity from LukF-PV mutants combined with different S components implies compatibility between the stem domains of these staphylococcal bicomponent leucotoxins. **Infect. Immun.** V.70 (3), p. 1310-1318, 2002.

ZOLLNER, T.M.; WICHELLAUS, T.A.; HARTUNG, A.; et al. Colonization with superantigen-producing *Staphylococcus aureus* is associated with increased severity of atopic dermatitis. **Clin. Exp. Allerg.** V. 30, p. 994-1000, 2000.

8. Anexos

Anexo1 – Relação dos hospitais/Laboratório e suas localizações

Sigla	Hospital	Cidade - Estado
HP-SP	Hospitais Públicos	São Paulo -SP
HUSP	Hospital Universitário	São Paulo - SP
HC-SP	Hospital das Clínicas	São Paulo - SP
HU-Stm	Hospital Universitário	Santa Maria – RS
HC-SLUC	Hospital São Lucas	Santa Maria – RS
HC-Rfe	Hospital das Clínicas	Recife - PE
FM-Ub	Hospital da Escola de Medicina	Uberaba – Minas Gerais
LMFlor	Hospital de Santa Luzia	Florianópolis - SC
HUBel	Hospital Universitário	Belém – Pará
HUMnaus	Hospital Universitário	Manaus - Amazônia
HUVit	Hospital Universitário	Vitória -ES
HUBsl	Hospital Universitário	Brasília - DF
LARP	Laboratório de Alimentos	Ribeirão Preto - SP
HG	Hospital Militar	São Paulo

Anexo2 – Relação dos resultados obtidos de PCR para os genes analisados em cepas Sensíveis à oxacilina

Isolados	Proc.	F. Isol.	agr	sea	seb	sec	sedee	tst	eta	etb	pvl	lucd	hla	h1b	h1g

C1	A	LCR	III	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+
C2	A	LP	I	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+
C3	A	Sg	III	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+
C4	A	LCR	III	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+
C5	A	LP	III	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+
C6	B	Sg	III	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
C7	B		III	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
C8	C	Sg	I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
C9	C	Sg	II	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+
C10	C	Sg	I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+
C11	D	Sg	II	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+
C12	D	Sg	III	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
C13	E	Sg	III	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
C14	E	Sg	II	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+
C15	F	Sg	III	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+
C16	F	Sg	III	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
C17	G	Sg	III	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
C18	H	Sg	III	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
C19	H		III	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
C20	H	Sg	III	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
C21	H	Sg	III	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
C22	I	Sg	III	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
C23	J	Sg	III	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
C24	L	Sg	II	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
C25	L	Sg	I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
C26	L	Sg	III	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
C27	L	Sg	III	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
C28	M	Sg	II	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
C29	N	Sg	I	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+
C30	N	Sg	II	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+
Al-1	O	Al	III	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+
Al-2	O	Al	III	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+
Al-3	O	Al	III	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
Al-4	O	Al	III	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+
Al-5	O	Al	III	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
Al-6	O	Al	I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
Al-7	O	Al	II	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+

As siglas e o n°. que acompanham cada cepa são apenas códigos de identificação das mesmas ; isolados **C₁₋₃₀** –isolados oriundos de material clínico; **Al₁₋₇** – isolados oriundos de alimentos relacionados a episódios de toxi-inecção alimentar; ; **A** - Cepas provenientes de pesquisas fenotípicas para enterotoxinas, oriundas de hospitais públicos de São Paulo; **B** – Hospital Universitário da USP; **C** - Hospital da clínicas de São Paulo; **D** – Hospital de Santa Maria, Rio Grande do Sul; **E** – Hospital de São Lucas – Rio Grande do Sul; **F** – Hospital da Clínicas de Recife; **G**– Hospital da Faculdade de medicina de Uberaba; **H** – Laboratório médico de Santa Luzia, Florianópolis; **I** – Hospital Universitário de Belém; **J** – Hospital Universitário de Manaus; **L** – Hospital Universitário de Vitória; **M** – Hospital Universitário de Brasília; **N**– Cepas provenientes de um hospital militar de São Paulo; **O** – Cepas provenientes de laboratório de microbiologia de alimentos de Ribeirão Preto
LCR- Líquido Céfal-Raquidiano; LP –Líquido Pleural; Sg –sangue; Al –Alimentos relacionados a episódios de toxi-infecção alimentar.

Anexo 3: Meios de cultura, soluções e reagentes utilizados em PGFE:

Ágar Lúria Bertani (Sambrook *et al.*, 1989)

Triptona	10,0 g
Extrato de levedura	5,0 g
Cloreto de Sódio (NaCl)	10,0 g
Ágar bacteriológico	15,0 g
H ₂ O destilada	1000 mL

A triptona, o extrato de levedura e o NaCl foram dissolvidos em 600 mL de água destilada e o pH foi acertado para 7,0 com uma solução de NaOH 1N. Em seguida, foi adicionado o ágar bacteriológico e fundido para ajustar o volume da solução para um litro com água destilada e esterilizado por autoclavação a 121°C por 15 minutos.

Caldo LB (Lúria Bertani) (Sambrook *et al.*, 1989)

Triptona	10,0 g
Extrato de levedura	5,0 g
Cloreto de Sódio (NaCl)	10,0 g
H ₂ O destilada	1000 mL

A triptona, o extrato de levedura e o NaCl foram dissolvidos em 600 mL de água destilada e o pH foi acertado para 7,0 com NaOH 1N. Em seguida, foi ajustado o volume da solução para um litro com água destilada e esterilizado por autoclavação a 121°C por 15 minutos.

Cont. Anexo 3: Meios de cultura, soluções e reagentes utilizados em PGFE:

Tampão EC

Tris 6mM	1,5mL de Tris 1M pH8,0
	1,5mL de Tris 1M pH7,0
EDTA 0,1M	5,0mL de EDTA 0,5M pH8,0

	5,0mL de EDTA 0,5M pH7,0	
NaCl 1M		29,22g
Brij58 0,5% (acetil éter de polioxietileno 20)		2,5g
Desoxicolato de sódio 0,2%	1,0g	
Sarkosyl 0,5% (N-Lauroilsarcosina, sal sódico)		2,5g

Ajustar o pH para 7,5, completar o volume para 500mL com água destilada deionizada e esterilizar por filtração.

Tampão ES

EDTA 0,4M, pH9,3	40,0mL de EDTA 625mM pH9,3
Sarkosyl 1%	10,0mL de sarkosyl a 5%

Preparar no momento do uso em quantidade suficiente.

Tampão CHEF-TE

Tris 0,1M pH7,5	2,5mL de Tris 1M pH8,0
	2,5mL de Tris 1M pH7,0
EDTA 0,1M pH7,5	5,0mL de EDTA 0,5M pH8,0
	5,0mL de EDTA 0,5M Ph7,0

Completar o volume para 50,0mL com água destilada deionizada e esterilizar a 121°C por 15 minutos.

Cont. Anexo 3: Meios de cultura, soluções e reagentes utilizados em PGFE:

Tampão DNS

Tris 0,1M pH8,0	5,0mL de Tris 1M pH8,0
Cloreto de magnésio 5mM	0,250mL de cloreto de magnésio 1M

Completar com água destilada deionizada estéril para 50mL. Preparar no momento do uso.

Agarose de baixo ponto de fusão a 2%

Agarose de baixo ponto de fusão	2g
Água destilada deionizada	100mL

Dissolver a agarose em água destilada deionizada em banho de água fervente e aliquotar em frascos contendo 10mL. Esterilizar a 121°C por 15 minutos e armazenar a 5°C.

Proteinase K

Dissolver 100mg de proteinase K (GibcoBRL, Life Technologies, USA) em 10mM de Tris HCl pH7,5, 20mM de cloreto de cálcio e 50% de glicerol. Armazenar a temperatura de -20°C.

Lisostafina

Solução estoque de lisostafina

Dissolver 1mg de lisostafina em 1mL de tampão de acetato de sódio 20mM pH4,5. Armazenar a temperatura de -20°C.

Cont. Anexo 3: Meios de cultura, soluções e reagentes utilizados em PGFE:

Solução de uso de lisostafina

Diluir a solução estoque 1:10 em tampão de acetato de sódio 20mM pH4,5.

Tampão Tris-Borato-EDTA (TBE)

TBE 10×

Tris base	121,1g
Ácido bórico	61,8g
Na ₂ EDTA	3,7g

Completar o volume com água destilada deionizada para 1000mL. Esterilizar a 121°C por 15 minutos e armazenar a temperatura ambiente.

TBE 0,5×

TBE 10×	50mL
Água destilada deionizada	950mL

Preparar no momento do uso.

Anexo 4: Fotografia do gel obtido da eletroforese de campo Pulsado (PGFE):