

CARACTERIZAÇÃO DE
Staphylococcus aureus
ENTEROTOXIGÊNICOS
UTILIZANDO AS TÉCNICAS DE
RAPD E SDS-PAGE

**FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**

**Caracterização de *Staphylococcus aureus*
enterotoxigênicos utilizando as técnicas de
RAPD e SDS-PAGE**

Fabiana Bertoni Bonetti
aluna

Prof. Dr. José Luiz Pereira
orientador

Tese apresentada a Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de *Mestre em Ciência de Alimentos*, área de *Microbiologia de Alimentos*.

PARECER

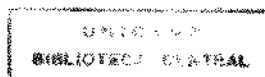
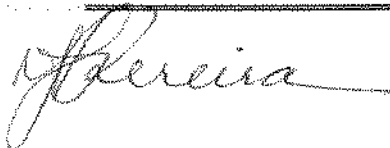
Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por FABIANA BERTONI BONETTI e aprovada pela Comissão Julgadora em 20 de março de 1996.

Campinas
1996

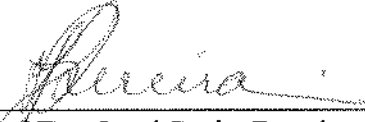
Campinas, 20 de março de 1996.

PROF.DR. JOSÉ LUIZ PEREIRA

Presidente da Banca



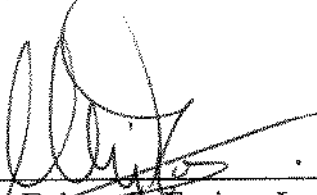
BANCA EXAMINADORA



Prof.Dr. José Luiz Pereira
(orientador)



Profª Drª Yoko Bomura Rosato
(membro)



Prof.Dr. Mauro Faber de Freitas Leitão
(membro)

Profª Drª Laura M. M. Ottoboni
(suplente)

Campinas (SP), de de 1996.

Aos meus pais, irmãos e Luiz com muito carinho

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. José Luiz Pereira pela orientação, apoio e estímulo demonstrados, e principalmente pela amizade e dedicação nestes dois anos de trabalho, incentivando sempre meu desenvolvimento acadêmico.

Sou muito grata à Prof^a Dr^a Yoko Bomura Rosato (CBMEG-UNICAMP) pela imensa dedicação, amizade e valiosa orientação durante todas as fases deste trabalho, pelo ensino das técnicas de Biologia Molecular e principalmente por permitir o desenvolvimento da tese em seu laboratório, onde fui recebida por pessoas simplesmente incríveis.

À Prof^a Dr^a Sonia Salzberg por ter despertado em mim, através da Iniciação Científica, o interesse pela vida acadêmica no mundo da Microbiologia.

Ao Prof. Dr. Mauro Faber de Freitas Leitão pela gentileza, estímulo e disponibilidade em todos os momentos que necessitei.

À Prof^a Dr^a Laura M. M. Ottoboni pelo exame prévio do manuscrito e sugestões críticas sobre a tese.

Aos amigos Henrique (“o chefinho”), Sandrinha (“minha amiga de bancada”) e Ed (“sempre tão cósssmico e vitaminado”) não tenho palavras para agradecer a inestimável ajuda e paciência aos meus nervosos pedidos de Socorro!!! no transcorrer da tese, tornando nossa amizade mais intensa e solidificada.

Ao amigo Luís Otávio Beriam (o “Bééryam”) do Instituto Biológico, pela orientação e secagem do gel de proteínas.

Ao pessoal do CBMEG (UNICAMP) pelas informações gerais e a boa receptividade sempre recebida no transcorrer da tese.

À doutoranda Ana Maria de Oliveira pelo fornecimento das linhagens selvagens de *Staphylococcus aureus* utilizadas neste trabalho.

Ao Gilson P. Manfio pelo cálculo do dendrograma referente a eletroforese de proteínas.

Ao Ronaldo Jacobucci pelos gráficos scaneados.

À equipe do laboratório da Prof^a Dr^a Glaucia Pastore (FEA- UNICAMP), principalmente a Enilene, Maricy, Érica, Rosely, Dora e Paulo pela paciência e ajuda na utilização da autoclave.

À todos os funcionários da Faculdade de Engenharia de Alimentos, principalmente a Cristiane e Margareth da Secretaria de Pós-Graduação e a Ana Maria, secretária da Diretoria, sempre tão atenciosas, pelos diversos serviços prestados.

Ao Marquinho do Departamento de Ciência de Alimentos (FEA-UNICAMP) pela impressão da tese.

À D^a Tetê por todo carinho e dedicação.

À Vera Mollo pela amizade e “altos papos” durante toda a tese.

À Norma T. N. Myia pela amizade, apoio e atenção em todos os instantes.

À Gabriela Alves Macêdo por ser minha amiga mesmo nos momentos mais difíceis.

Ao Luiz Piccoloto Neto pela paciência, apoio e companheirismo sempre.

Aos meus pais, Gil e Helô, por todo o carinho e compreensão durante todo o tempo.

Agradeço imensamente a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro recebido.

RESUMO

Um total de 26 linhagens enterotoxigênicas de *Staphylococcus aureus* foram caracterizadas utilizando-se os perfis de fragmentos de DNA gerados pela técnica de RAPD por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e os perfis eletroforéticos de proteínas totais obtidos por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE). Dezesete linhagens foram isoladas de leite cru de diferentes fazendas do estado de São Paulo, e cinco foram provenientes de presunto adquirido em padarias da cidade de Campinas (SP). As quatro linhagens restantes foram as linhagens 772 (EEA), S6 (EEB), 1230 (EEC) e 1151 (EED) fornecidas pelo Food Research Institute - FRI, Madison, USA. Cinco primers compostos de 10 pares de bases foram utilizados para gerar os perfis de fragmentos de DNA, que variaram de 0.5 a 4.0 kb. As 26 linhagens foram agrupadas em 2 sub-grupos a um nível de 40% de similaridade, revelando uma variabilidade muito grande entre elas. O perfil eletroforético de proteínas totais permitiu discriminação visual das linhagens, que foram agrupadas em 2 sub-grupos a um nível de similaridade de 90 a 100%. Os resultados deste trabalho revelaram não haver correlação entre as características obtidas pelas duas técnicas (RAPD e SDS-PAGE) e a produção de toxinas.

SUMMARY

A total of 26 enterotoxigenic strains of *Staphylococcus aureus* were characterized by random amplification of polymorphic DNA (RAPD) profiles using polymerase chain reaction (PCR), and by whole-cell protein patterns using sodium dodecyl sulfate-polyacrilamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Seventeen strains were isolated from raw milk, obtained from several farms in the same geographic location in the state of São Paulo, and five strains were isolated from ham bought in different bakeries from campinas (SP) city. The other four strains were 772 (SEA), S6 (SEB), 1230 (SEC) and 1151 (SED) provided by Food Research Institute- FRI, Madison, USA. Five primers, each one of 10 bp were used to generate the RAPD profiles. The molecular size of the fragments ranged of 0.5 to 4.0 kb. The 26 strains were clustered into two sub-groups at the 40% similarity level, this showing a great variability among them. Protein patterns allowed visual discrimination of strains, which were clustered into two sub-groups at the 90 to 100% similarity level. In this study, the results revealed that there is no correlation between the characteristics obtained in these two techniques (RAPD and SDS-PAGE) and the toxin production.

ÍNDICE

	Página
Resumo.....	i
Summary.....	ii
Índice.....	iii
Índice de Tabelas.....	v
Índice de Figuras.....	vi
Abreviaturas.....	viii
1. Introdução.....	1
2. Revisão de Literatura.....	5
2. 1. Taxonomia de <i>Staphylococcus aureus</i>	5
2. 2. Características fisiológicas e bioquímicas do microrganismo....	6
2. 3. <i>Staphylococci</i> atípicos.....	7
2. 4. Enterotoxinas estafilocócicas.....	8
2. 4. 1. Características físico-químicas das enterotoxinas.....	9
2. 4. 2. Toxicidade e mecanismo de ação das enterotoxinas.....	11
2. 5. Genes toxigênicos de <i>Staphylococcus aureus</i>	13
2. 6. Caracterização molecular de linhagens bacterianas.....	16
2. 6. 1. Análise de Proteínas.....	17
2. 6. 2. Análise de DNA.....	19
3. Material & Métodos.....	25
3. 1. Linhagens de <i>S.aureus</i>	25
3. 2. Meios de cultura.....	28

3. 3. Extração e Purificação do DNA cromossômico.....	28
3. 4. Diálise do DNA cromossômico.....	28
3. 5. Quantificação do DNA cromossômico.....	29
3. 6. RAPD por Reação em Cadeia da Polimerase.....	29
3. 7. Eletroforese do DNA amplificado.....	30
3. 8. Análise dos perfis dos fragmentos gerados por RAPD.....	33
3. 9. Extração de proteínas totais de <i>S.aureus</i>	33
3. 10. Preparo dos géis de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE).....	34
3. 11. Eletroforese de proteínas totais em gel de SDS-PAGE.....	35
3. 12. Coloração de proteínas por impregnação por prata.....	36
3. 13. Análise dos géis SDS-PAGE.....	36
4. Resultados.....	38
4. 1. Perfil de fragmentos de DNA gerados por RAPD.....	38
4. 2. Perfil eletroforético de proteínas totais.....	46
5. Discussão.....	56
6. Conclusões.....	61
7. Referências Bibliográficas.....	63

ÍNDICE DE TABELAS

Tabelas	Página
1. Características das enterotoxinas estafilocócicas.....	10
2. Procedência das linhagens de <i>Staphylococcus aureus</i>	26
3. Caracterização das linhagens selvagens utilizadas.....	27
4. <i>Primers</i> utilizados nas reações de RAPD.....	31
5. Volume das soluções estoques utilizados no preparo dos géis....	34
6. Sequência de tratamento do gel de poliacrilamida para a coloração de proteínas com prata.....	37

ÍNDICE DE FIGURAS

Figuras	Página
1. Representação simplificada da Reação em Cadeia por Polimerase (PCR).....	21
2. Eletroforese de Produtos de RAPD (OPQ1) das linhagens de <i>S.aureus</i>	40
3. Eletroforese de Produtos de RAPD (OPQ6) das linhagens de <i>S.aureus</i>	41
4. Eletroforese de Produtos de RAPD (OPQ12) das linhagens de <i>S.aureus</i>	42
5. Eletroforese de Produtos de RAPD (OPR1) das linhagens de <i>S.aureus</i>	43
6. Eletroforese de Produtos de RAPD (OPR5) das linhagens de <i>S.aureus</i>	44
7. Dendrograma referente aos produtos de RAPD.....	45
8. Perfis eletroforéticos de proteínas totais das linhagens A1, A2, A4, C1, C2, D1 e D2 de <i>S.aureus</i>	48
9. Perfis eletroforéticos de proteínas totais das linhagens A, C, C4, C5 e C6 de <i>S.aureus</i>	49
10. Perfis eletroforéticos de proteínas totais das linhagens B e D de <i>S.aureus</i>	50
11. Perfis eletroforéticos de proteínas totais das linhagens B1, B2,	

B3, B4, A5 e A6 de <i>S.aureus</i>	51
12. Perfis eletroforéticos de proteínas totais das linhagens C3, D3, D4, D6 de <i>S.aureus</i>	52
13. Perfis eletroforéticos de proteínas totais das linhagens A, B, C, D, C2, C5, D3, B4, A3 e D5 de <i>S.aureus</i>	53
14. Traços densitométricos das linhagens de <i>S.aureus</i>	54
15. Dendrograma referente aos perfis eletroforéticos de proteínas totais, obtido por SDS-PAGE, das linhagens de <i>S.aureus</i>	55

ABREVIATURAS

bp	pares de bases
dATP	desoxiadenosina 5'-trifosfato
dCTP	desoxicitidina 5'-trifosfato
dGTP	desoxiguanosina 5'-trifosfato
DNA	ácido desoxiribonucleico
dTTP	desoxitimidina 5'-trifosfato
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
g	grama
kb	10^3 pares de bases
kDa	10^3 Dalton
l	litro
M	concentração Molar
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina
µg	micro (10^{-6}) grama
µl	micro (10^{-6}) litro
mg	mili (10^{-3}) grama
mM	mili (10^{-3}) mol
min	minuto
ml	mili (10^{-3}) litro
pmol	pico (10^{-12}) mol
PAGE	gel de poliacrilamida (<i>Polyacrilamide Gel Electrophoresis</i>)

PCR	reação em cadeia por polimerase
p/v	peso / volume
RAPD	Técnica de amplificação de DNA utilizando primers de sequência arbitrária (<i>Random Amplified Polymorphic DNA</i>)
SDS	dodecil sulfato de sódio
Tris	Tris (hidroximetil) aminoetano
UPGMA	Método de agrupamento em pares sem atribuição de peso, usando médias algorítmicas (<i>Unweighted Pair Group Method using Algorithm</i>).

1. INTRODUÇÃO

Staphylococcus aureus é uma bactéria que apresenta grande interesse de estudo no que diz respeito à patogenicidade animal, visto que é ocasionalmente isolada de mastite bovina (BAUMGARTNER, 1984) e quanto à toxicidade humana, devido à produção de enterotoxinas frequentemente envolvidas em surtos de intoxicação alimentar e síndrome do choque tóxico (GENIGEORGIS, 1989). Ultimamente, esse agente infeccioso também vem merecendo atenção dos pesquisadores por encontrar-se associado à sérias infecções hospitalares (LEE e BURNIE, 1988).

A ação patogênica deve-se à produção de mais de trinta metabólitos extracelulares constituídos de toxinas e enzimas, manifestando-se nas mais variadas formas de intoxicações e infecções (IANDOLO, 1989). Sua versatilidade nutricional e capacidade de crescimento em condições ambientais fazem desenvolvê-lo em alimentos das mais variadas composições, favorecendo a produção de metabólitos tóxicos que se ingeridos, podem vir a causar surtos de intoxicação (ARBUTHNOTT, 1990).

Até o presente momento são conhecidas as enterotoxinas estafilocócicas EEA, EEB, EEC₁, EEC₂, EEC₃, EED, EEE, EEF (TSST-1) (BERGDOLL, 1983), EEG (ainda não purificada) (BETLEY *et al.*, 1992) e, mais recentemente, EEH (SU e WONG, 1995), proteínas com baixo peso molecular e com características antigênicas distintas.

O método microbiológico convencional de isolamento e identificação de linhagens enterotoxigênicas de *S.aureus* requer de 4 a 8 dias para ser concluído. Normalmente o isolamento se dá num meio seletivo como o Baird-Parker e a identificação, através de uma bateria de testes bioquímicos (WILSON *et al.*, 1991). A enterotoxigenicidade pode ser testada através de métodos imunológicos, como o RIA (Radio Immuno Assay), o RPLA (Reversed Passive Latex Agglutination) e o ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) (SHINGAKI *et al.*, 1981), além dos métodos comerciais de imunodifusão em gel, ainda utilizados em muitos laboratórios do mundo.

As toxinas estafilocócicas podem estar presentes em alimentos, mesmo que as análises microbiológicas apresentem resultados negativos quanto à presença de *Staphylococcus aureus*, isso se deve ao fato de que estas proteínas apresentam uma elevada estabilidade térmica. Fatores químicos podem mascarar a presença de enterotoxinas em testes imunológicos, resultando em reações falso-negativas, particularmente à baixas concentrações de enterotoxinas. Diferenças no crescimento microbiano de *S.aureus* e na produção de suas enterotoxinas em diversos alimentos têm sido relatadas (GOMEZ-LUCÍA *et al.*, 1989). Durante análise de alimentos suspeitos em laboratório, uma série de fatores podem vir a interferir na quantidade de enterotoxina estafilocócica produzida, como por exemplo, pH, temperatura, atividade de água, concentração de NaCl, necessidades nutricionais, condições atmosféricas (GENIGEORGIS, 1989).

Várias metodologias envolvendo linhagens de *Staphylococcus aureus* têm sido descritas na literatura no sentido de melhor elucidar questões a respeito de surtos de intoxicação alimentar, mastite bovina, infecção hospitalar e taxonomia. O emprego de técnicas de biologia molecular tem propiciado maior rapidez e confiabilidade nos resultados permitindo melhor caracterização além de uma detecção fácil e segura.

Ao lado da tradicional fagotipagem, biotipagem, sorotipagem (DAVIDSON, 1972), a análise do perfil plasmidial (MATTHEWS *et al.*, 1992), a eletroforese em gel de campo pulsado (BRANCHINI *et al.*, 1993) e outros métodos moleculares têm sido aplicados.

A utilização da eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE) tem aumentado em estudos de sistemática bacteriana (JACKMAN, 1985) e de acordo com CLINK e PENNINGTON (1987), a técnica tem sido aplicada com sucesso na identificação de linhagens envolvendo diferentes espécies de *Staphylococcus*. COSTAS *et al.* (1989) sugeriram perfis de proteínas totais por SDS-PAGE como critérios adicionais em estudos epidemiológicos envolvendo *S.aureus* resistentes à meticilina (MRSA).

O uso da reação em cadeia por polimerase (PCR) com *primers* de oligonucleotídeos para produzir *fingerprints* (impressão digital) de DNA de linhagens bacterianas tem revolucionado o estudo dos microrganismos

(COUTINHO *et al.*, 1993). Esta técnica consiste em detectar polimorfismos de DNA entre linhagens, envolvendo a amplificação de um DNA *template* que resulta em distintos espectros de fragmentos do DNA amplificado (WELSH *et al.*,1990). Comparando esta técnica com outros métodos de detecção existentes, pode-se afirmar que trata-se de uma metodologia de fácil execução e interpretação. Sua utilização foi relatada na detecção de genes de *S.aureus* enterotoxigênicos (TSEN *et al.*, 1992).

Recentemente, uma nova técnica de *fingerprinting* de DNA, o ensaio de RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), tem sido amplamente descrita (WELSH *et al.*,1990 ; WILLIAMS *et al.*,1990) proporcionando uma nova metodologia na caracterização de bactérias (STEPHAN *et al.*,1994). A técnica utiliza pequenos *primers* únicos de sequência arbitrária para amplificação de DNA genômico. Os perfis dos produtos da amplificação, obtidos após separação eletroforética, podem ser usados como fingerprints das linhagens de várias espécies de microrganismos (MAZURIER *et al.*, 1992). O ensaio de RADP é rápido, tecnicamente simples e não requer conhecimento anterior da sequência do DNA genômico. Mudanças mínimas na sequência do *primer* podem produzir mudanças nos *fingerprints* tornando possível a discriminação visual entre linhagens (YOUNG *et al.*, 1994).

Diante das dificuldades (tempo, custo) encontradas através das técnicas convencionais, optou-se neste trabalho pelo emprego da técnica molecular RAPD e da técnica quimiotaxonômica SDS-PAGE para a avaliação das linhagens enterotoxigênicas selvagens de *Staphylococcus aureus* e principalmente sua comparação com as linhagens de referência procedentes do "Food Research Institute", University of Wisconsin, Madison, USA.

Apesar da técnica de PCR ser recente, ela tem sido bastante difundida no campo da Biologia Molecular. Neste trabalho, com a metodologia de RAPD utilizando *primers* de 10 pares de bases de sequência randômica, foram obtidos perfis dos fragmentos do DNA de todas as linhagens.

Com a finalidade de averiguar a variabilidade entre as linhagens, e a possibilidade de organizar esta variabilidade em sub-grupos, foram obtidos, além dos perfis dos fragmentos de DNA gerados por RAPD, os perfis eletroforéticos das proteínas celulares totais através da eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE).

Com a utilização dessas duas técnicas, procurou-se verificar a existência de correlação entre os produtos de RAPD e perfis eletroforéticos de proteínas totais com a capacidade de produção de enterotoxinas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2. 1. Taxonomia de *Staphylococcus aureus*

O *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (SCHLEIFER, 1986), apresenta a família *Micrococcaceae* composta por 4 gêneros : *Micrococcus*, *Stomatococcus*, *Planococcus* e *Staphylococcus*. O gênero *Staphylococcus* encontra-se subdividido em 19 espécies e sub-espécies reconhecidas. No entanto, FRENEY *et al.* (1988) citaram que 23 espécies do gênero *Staphylococcus* já foram identificadas.

A quantidade das bases nitrogenadas guanina + citosina (G + C) do DNA, bem como a composição da parede celular, e a capacidade de crescer e fermentar glicose anaerobicamente constituem em importantes aspectos para a diferenciação do gênero *Staphylococcus* dos demais (BERGDOLL, 1979).

As três espécies de *Staphylococcus* (*S.aureus*, *S.intermedius* e *S.hyicus* sub. *hyicus*) apresentam a capacidade de coagular o plasma de coelho. A produção da enzima desoxiribonuclease termoresistente é característica conferida a *S.aureus*, *S.intermedius*, *S.hyicus* sub. *hyicus*, *S.carnosus* (a reação é retardada para esta espécie) e as espécies *S.epidermidis*, *S.simulans* e *S.hyicus* sub. *chromogenes* são negativas ou fracamente positivas (GENIGEORGIS, 1989).

Outras espécies do gênero *Staphylococcus*, não só *S.aureus*, tem sido descritas como capazes de produzir enterotoxinas, como *S.hyicus*, *S.chromogenes*, *S.intermedius*, *S.saprophyticus*, *S.lentus*, *S.warneri* e *S.sciuri* (VALLE *et al.*, 1990).

2. 2. Características fisiológicas e bioquímicas do microrganismo

Staphylococcus aureus são cocos, Gram positivos, anaeróbio-facultativos, catalase fortemente positiva, não móveis, não fotossintéticos e não formadores de esporos (MINOR e MARTH, 1972). São microrganismos mesófilos que possuem temperatura ótima de crescimento a 37°C, crescendo melhor sob condições aeróbias. Segundo PEREIRA e SALZBERG (1982) algumas linhagens apresentam a capacidade de crescimento melhor a 39-40 °C, enquanto outras conseguem se desenvolver a 10 °C conforme relatado por MINOR e MARTH (1972). O pH ótimo para crescimento de *S.aureus* está na faixa de 6,0 a 7,0, podendo o microrganismo crescer num intervalo de 4,0 a 9,8 como demonstrado por TATINI (1973).

Sobre o efeito da atividade de água (a_w) no crescimento de *S.aureus*, TATINI (1973) demonstrou que a a_w ótima para o microrganismo crescer é maior que 0,99, com uma variação de 0,83 a > 0,99, e relatou que *S.aureus* é capaz de se desenvolver até em concentração de 20% de cloreto de sódio.

Quanto à produção da enzima coagulase, na identificação de *S.aureus*, tem sido demonstrado que esta propriedade não é única desta espécie, mas também de *S.intermedius*, *S.chromogenes* e *S.hyicus* (GILMOUR e HARVEY, 1990).

A produção da enzima desoxiribonuclease termoresistente (TNase) é muito comum em estafilococos coagulase positivos (PARK *et al.*, 1980) consistindo portanto num fator importante no que diz respeito a identificação de *S.aureus*.

A determinação das enzimas coagulase e TNase é amplamente utilizada para indicar a existência de estafilococos enterotoxigênicos (VARADARAJ e RANGANATHAN, 1985).

2. 3. *Staphylococci* atípicos

Diversos trabalhos têm estudado a existência da correlação da produção das enzimas coagulase e TNase (BENNETT *et al.*, 1986). Ainda que muitos estafilococos sejam enterotoxigênicos, a produção destas enzimas não implica na sua enterotoxigenicidade (OLIVEIRA, 1995) uma vez que a produção das enterotoxinas por linhagens *staphylococci* coagulase positiva e negativa já foi relatada (EVANS *et al.*, 1950). As linhagens coagulase negativa, originalmente foram classificadas como estafilococos atípicos, pois não poderiam ser classificadas como *S.aureus*, *S.epidermidis* ou *S.saprophyticus* (LOTTER e GENIGEORGIS, 1975).

Segundo SPERBER (1976) devido a existência destas linhagens coagulase negativa serem capazes de produzir enterotoxinas, a produção de TNase é reconhecida como principal critério na identificação de *S.aureus*, no entanto experimentos realizados por DANIELSON e HELLBERG (1977, 1984) citam a produção das enterotoxinas A, B e C₁ por estafilococos coagulase negativos sem que o teste de TNase fosse realizado.

FUKUDA *et al.* (1984) reportaram que 24% de 210 linhagens de *S.intermedius* (coagulase negativas e desoxiribonuclease termoresistente positivas) provenientes de animais domésticos produziram uma ou mais enterotoxinas A, B ou C.

CRASS e BERGDOLL (1986) também descreveram a produção de enterotoxina tipo A e C por *Staphylococci* e *S.epidermidis*. Algumas linhagens produziram concomitantemente enterotoxina A e toxina TSST-1.

NANU e NARAYAN (1992) pesquisando estafilococos em produtos cárneos e plantas de processamento na Índia, relataram também a capacidade enterotoxigênica de seis culturas não produtoras de coagulase.

Contrariamente do que se reportava no passado, onde tentavam-se relacionar características fenotípicas de *S.aureus* com a produção de enterotoxina, GENIGEORGIS (1989) afirma a não existência desta correlação entre enterotoxigenicidade e positividade de testes auxiliares.

2. 4. Enterotoxinas estafilocócicas

As enterotoxinas estafilocócicas estão classificadas, de acordo com suas propriedades antigênicas, em 5 grupos e são assim denominadas : EEA, EEB, EEC (grupo subdividido em EEC₁, EEC₂, EEC₃), EED e EEE (BERGDOLL, 1983). Uma sexta toxina EEF, também foi descrita e tem sido implicada como o agente causador da síndrome do choque tóxico. Não tem sido denominada como enterotoxina e sim como a toxina-1 da síndrome do choque tóxico (TSST-1) (BERGDOLL, 1981).

A recente descoberta de um novo gene responsável pela produção de enterotoxina, denominado *seg+*, através de estudos com DNA de linhagens de *S.aureus* e mutantes, utilizando a técnica de hibridização de DNA, indicou que uma nova toxina emética é por ele codificada. Este gene foi sequenciado , mas a proteína denominada EEG ainda não se encontra identificada (BETLEY *et al.*, 1992).

Recentemente, uma nova enterotoxina, antigenicamente distinta das demais, denominada EEH foi identificada, purificada e parcialmente caracterizada (SU e WONG, 1995).

De acordo com BERGDOLL (1989), ainda permanecem desconhecidas cerca de 5% de enterotoxinas que não se agrupam às outras até então mencionadas, embora sejam reconhecidamente aptas para provocar emese em macacos, conforme verificado em estudos com *S.hyicus* isolados à partir de animais (HOOVER *et al.*, 1983). Este fato foi também recentemente abordado por SU e WONG (1993) que trabalharam com uma linhagem produtora de algum tipo de enterotoxina estafilocócica ainda não identificada.

2. 4. 1. Características físico - químicas das enterotoxinas

As enterotoxinas estafilocócicas são proteínas simples de peso molecular situado entre 26.000 a 29.000 daltons e estruturadas em uma única cadeia polipeptídica rica em lisina, tirosina e ácidos aspártico e glutâmico. Possuem dois resíduos de cisteína, na posição 106 próxima ao centro da molécula, que formam uma alça de cisteína através de pontes de dissulfeto. Quando encontram-se em estado ativo, as enterotoxinas se mostram resistentes à ação de enzimas proteolíticas como pepsina, tripsina, quimiotripsina, papaína e renina (VARADARAJ e RANGANATHAN, 1989 ; BERGDOLL, 1989, 1990 ; TRANTER, 1990). Apresentam também a propriedade de termoresistência conforme relatado por BAIRD - PARKER (1990).

De acordo com BERGDOLL e ROBBINS (1973), estruturalmente, o sítio de toxicidade da molécula proteica parece estar relacionado com os diversos resíduos e a sequência de aminoácidos que envolve a alça de cisteína, na ponte de dissulfeto. O fato desta sequência ser distinta entre as enterotoxinas, leva a supor que ao longo do processo evolutivo a cadeia proteica tenha sofrido substituições nos resíduos de aminoácidos o que conferiu à molécula características imunológicas diferenciadas mas, mantendo inalterado o sítio envolvido com a propriedade tóxica.

A análise da sequência de aminoácidos destas proteínas revelou uma grande similaridade entre EEA e EEE, enquanto EEB e EECs formam outro grupo similar. Por outro lado, EED foi considerada como uma molécula distinta, assemelhando-se mais ao grupo EEA e EEE (BAYLES e IANDOLO, 1989).

As características das enterotoxinas estafilocócicas estão indicadas na Tabela 1.

TABELA 1 - Características das enterotoxinas estafilocócicas

TIPO	PESO MOLECULAR (daltons)[*]	PONTO ISOELÉTRICO
A	27.100	8,1 ; 7,3
B	28.366	8,3 ; 8,6 9,1 ; 9,4
C ₁	27.496	8,8 ; 9,2
C ₂	27.532	5,6 ; 6,9 7,5 ; 7,6
C ₃	27.438	8,2
D	26.360	8,4
E	26.425	8,0
** H	28.500	5,7

* calculado pela sequência nucleotídica (TRANter, 1990)

** SU & WONG (1995)

2. 4. 2. Toxicidade e mecanismo de ação das enterotoxinas

Staphylococcus aureus tem a capacidade de metabolizar mais de 34 proteínas extracelularmente e muitas dela parecem estar envolvidas no processo de patogenicidade e virulência da bactéria (IANDOLO, 1989).

Os sintomas clássicos observados na intoxicação estafilocócica são o vômito e a diarreia, podendo também aparecer calafrios, dores abdominais e náuseas. Muito raramente a febre é observada. O período de incubação pode variar de 30 minutos a 8 horas, com um tempo médio de 4 horas (BETLEY, 1994).

As intoxicações alimentares causadas pela ingestão de enterotoxinas, previamente elaboradas nos alimentos, apresentam durabilidade fugaz, com caráter não fatal, com restabelecimento observado em torno de 24 a 72 horas (BERGDOLL, 1990), embora de duração curta, o surto de intoxicação pode assumir proporções maiores dependendo da população afetada.

O alvo de ação das enterotoxinas é o trato digestivo, embora alterações na pressão arterial e temperatura indicando a passagem das enterotoxinas do estômago e trato intestinal para o sistema circulatório, ainda que em níveis muito baixos, já tenham sido evidenciadas (BERGDOLL, 1983).

A reação de vômito é decorrente do estímulo dos receptores eméticos, localizados no estômago e intestino, que é transmitido via vago e nervos simpáticos até o centro do vômito (TRANTER, 1990). Por sua vez, o estímulo diarreico, considerado o segundo mais comum sintoma da intoxicação alimentar, tem o seu mecanismo ainda não totalmente elucidado. Acredita-se que possa ser atribuído à inibição da absorção da água, de forma semelhante ao mecanismo de ativação de adenil ciclase como ocorre em enterobactérias com consequente aumento do fluxo de líquido transmucoso ao lúmen intestinal (BERGDOLL, 1970).

Recentemente, as enterotoxinas têm sido estudadas quanto ao profundo efeito que exercem sobre o sistema imune, visto que são potentes indutores da produção de mensageiros químicos (interleucina-1, interleucina-2, fator necrosante tumoral e interferon- γ) apresentando a capacidade de aumentar ou

reprimir a produção de anticorpos, e de induzir a proliferação dos linfócitos T (FAST *et al.*, 1989). Com base nos efeitos que exercem sobre as células T, as enterotoxinas têm sido denominadas de “superantígenos” (MARRACK e KAPPLER, 1990).

TRANTER(1990) sugeriu que estas observações podem contribuir para um melhor entendimento da ação das toxinas, como por exemplo, a possibilidade da ativação de células T, acompanhada pela secreção de linfocinas, responsáveis por alguns efeitos patológicos causados pelas toxinas no homem, incluindo vômito, diarreia e choque.

Contrariamente, HARRIS *et al.* (1993) ao trabalharem com linhagens enterotoxigênicas produtoras de enterotoxina A e B e linhagens mutantes, afirmaram que não há uma perfeita correlação estabelecida entre a proliferação de células T provocada pelas enterotoxinas (atividade imunológica) e a atividade emética (BETLEY e HARRIS, 1994)

2. 5. Genes toxigênicos de *Staphylococcus aureus*

Os determinantes genéticos envolvidos na síntese de enterotoxinas permanecem ainda não totalmente elucidados (IANDOLO, 1989).

A primeira evidência da localização cromossomal do gene *sea+*, responsável pela produção de EEA, foi relatada por SHAFER e IANDOLO (1978) que não associaram EEA a nenhum plasmídio detectável. Técnicas convencionais de transformação demonstraram que *sea+* está localizado no cromossomo entre os marcadores *pur-110* e *ilv-129* em 24 de 29 linhagens de *S.aureus* examinadas (PATTEE e GLATZ, 1980 ; MALLONEE *et al.*, 1982). O fato de que para 5 linhagens *sea+* não apresentou a mesma localização entre os marcadores *pur* e *ilv* (purina e isoleucina-valina) ou mesmo em nenhuma outra região, sugere que *sea+* ou um gene necessário para sua expressão pode ser um elemento genético móvel (MALLONEE *et al.*, 1982).

Comparando-se os perfis obtidos por hibridização de DNA total de linhagens *Sea+* e *Sea-*, BETLEY *et al.* (1984) aventaram a possibilidade de que *sea+* esteja localizado num fragmento de 8 - 12 kilobases (kb). Com a finalidade de se estabelecer a identificação deste elemento, estudos sobre produção de EEA estar associada a fagos, tiveram que ser reexaminados (CASMAN, 1965 ; JARVIS e LAWRENCE, 1971).

Um fago isolado de *S.aureus* PS42-D (denominado fago PS42-D) possui DNA que hibridiza com uma sonda derivada de *sea+*, o que vem a demonstrar que um gene estrutural para EEA está contido no fago, que por sua vez contém uma molécula linear de DNA de 42 kb com extremidades coesivas e um sítio de ligação (*attP*) localizado próximo ao meio da molécula (BETLEY e MEKALANOS, 1985). Baseado nos estudos genéticos, o gene *sea+* está contido em fagos que apresentam um sítio preferido de integração ao cromossomo na região *pur - ilv* (PATTEE e GLATZ, 1980 ; MALLONEE *et al.*, 1982 e BETLEY e MEKALANOS, 1985).

Através de análises de hibridização de DNA e RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), demonstrou-se que *sea+* está associado a uma família de fagos similares, porém não idênticos (BETLEY e MEKALANOS, 1985), e também que a incapacidade de se detectar *sea+*

fágicos em todas as linhagens *Sea+* é devido a presença de fagos imperfeitos ou fagos com sequência alterada (CASMAN, 1965 ; BETLEY e MEKALANOS, 1985).

O gene *see+* que codifica a enterotoxina E, identificado quando isolado do banco genômico de uma linhagem de *S.aureus*, foi expresso em *E.coli* e codificou uma proteína extracelular de 26.425 Da, que após reação imunológica foi confirmada como sendo EEE (COUCH *et al.*, 1988). Estes mesmos pesquisadores afirmaram que *see+* é parte de um fago que está relacionado com a família de fagos que contém *sea+* e ainda, sugeriram que este mesmo gene pode estar relacionado com fagos imperfeitos.

Pesquisas sobre os determinantes genéticos de EEB enfatizam a instabilidade estrutural de gene *seb+* (RANELLI *et al.*, 1985) e sugerem que este gene possivelmente seja parte de um elemento genético móvel como um fago ou um transposon (BETLEY *et al.*, 1986). Entretanto, a possibilidade de *seb+* tratar-se de um transposon comum foi eliminada quando JOHNS e KHANS (1988) determinaram seu tamanho (26.8 kb), e ainda levantaram a possibilidade do elemento que contém *seb+* tratar-se de um plasmídio integrado.

Um trabalho, citado na literatura, examinando uma linhagem de *S.aureus* de origem clínica, relata a existência de um plasmídio, denominado pZA10, de 56.2 kb, que aparentemente parecia conter *seb+* e *sec+* (ALTBOUM *et al.*, 1985). Várias linhagens *Seb+* não tinham nenhum plasmídio detectável associado a expressão de *seb+* e assim sendo, este gene foi considerado de localização cromossômica nestas linhagens.

Dentre os genes responsáveis pela produção das enterotoxinas, o gene *sec+* é o menos caracterizado quanto à sua localização. Como mencionado anteriormente, o plasmídio pZA10 aparentemente contém *sec+* (ALTBOUM *et al.*, 1985), entretanto, em todas as outras linhagens examinadas *sec+* não foi associado a nenhum plasmídio detectável (BOHACH e SCHLIEVERT, 1987 ; BETLEY *et al.*, 1981) e , por esta razão, assumiu-se que *sec+* possui localização cromossomal.

Os estudos genéticos envolvendo a enterotoxina D, não tem sido até o momento objeto de tantos estudos como das demais. Segundo BAYLES e IANDOLO (1989) que têm trabalhado ativamente nesta área, o gene *sed+* seria de origem plasmidial e estaria contido num plasmídio de 27.6 kb relacionado com resistência à penicilina e ao cádmio. Pelo menos 21 linhagens *Sed+* foram examinadas e todas apresentaram plasmídios contendo *sed+* com padrões idênticos de restrição (IANDOLO, 1989 ; SOLTIS *et al.*, 1990 e BAYLES e IANDOLO, 1989).

Mais recentemente, BETLEY et al. (1992) examinaram o DNA de linhagens de *S.aureus* que produziram enterotoxinas desconhecidas e identificaram o gene de uma nova enterotoxina, denominado de *seg+*. a descoberta deste gene se deu através da hibridização do DNA da linhagem *S.aureus* MJB801 contendo *seg+* com uma sonda contendo *sec+*. As análises dos clones estafilocócicos recombinantes indicaram uma toxina emética, EEG, que é codificada por *seg+*. A proteína EEG ainda não se encontra purificada e o gene *seg+* embora já tenha sido sequenciado (BETLEY et al., 1992 ; MUNSON e BETLEY, 1991) ainda não possui localização determinada no genoma.

Quanto a recente descoberta da nova enterotoxina estafilocócica H por SU e WONG (1995), embora exista um trabalho destes pesquisadores quanto a caracterização de EEH, não há ainda na literatura menção sobre o gene que a codifica e nem sua localização.

O advento da Tecnologia do DNA Recombinante (TDR) tem permitido a identificação, clonagem e sequenciamento de genes responsáveis pela produção de várias toxinas e fatores de virulência, entretanto muitas questões a respeito da regulação e expressão gênica ainda precisam ser elucidadas (IANDOLO, 1989).

2. 6. Caracterização molecular de linhagens bacterianas

Segundo BERGDOLL (1972) a identificação de *Staphylococcus aureus* pode ser feita através da análise morfológica das células e de uma bateria de testes bioquímicos e fisiológicos. No entanto, apesar do número expressivo de testes, nem sempre se chega a resultados conclusivos, que permitam afirmar qual é a espécie em estudo, além de consumir muito tempo e material. A realização de uma série de testes bioquímicos de caracterização de uma linhagem de *Staphylococcus* pode representar apenas 1% do potencial genético (PRIEST e AUSTIN, 1993), que é a fonte de toda informação taxonômica.

O genoma bacteriano é responsável pela produção de quase 2.000 proteínas, com funções enzimáticas ou estruturais. A eletroforese de proteínas celulares totais em gel de poliacrilamida (PAGE), técnica amplamente utilizada na taxonomia bacteriana, promove a separação parcial em bandas individuais representando muitas das proteínas que compõe a célula bacteriana. Embora este padrão reprodutível seja complexo, representa o *fingerprint* da linhagem e pode ser usado para efeitos comparativos (PRIEST e AUSTIN, 1993), aumentando o poder discriminatório do método (COSTAS *et al.*, 1989).

2. 6. 1. Análise de Proteínas

A eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) de proteínas bacterianas solubilizadas através de tratamento com dodecil sulfato de sódio (SDS), não é uma metodologia recente, mas ainda vem sendo amplamente utilizada em estudos de taxonomia (CLINK e PENNINGTON, 1987).

As bandas proteicas reveladas no gel eram usualmente submetidas à comparação visual com os padrões, consistindo portanto numa análise subjetiva, até que KERSTERS e DE LEY (1975) introduziram a análise por densitometria com auxílio de computador, promovendo assim análises rápidas, fáceis e de muita utilização na classificação e identificação das bactérias.

A técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS continua sendo usada com sucesso por alguns pesquisadores, como é o caso de CLINK e PENNINGTON (1987) que estudaram 4 espécies de *Staphylococcus* (*S.aureus*, *S.epidermidis*, *S.saprophyticus* e *S.capitis*) e através da análise visual das bandas de proteínas obtidas, sugeriram que embora SDS-PAGE possa ser utilizada na identificação de espécies de *Staphylococcus*, este tipo de análise não se constitui uma base para sua caracterização. Foram observadas diferenças entre linhagens de mesma espécie, confirmando os estudos de KRIKLER *et al.*(1986) que demonstraram pequenas variações nos perfis de linhagens de *S.aureus*, e também de acordo com VAN BELKUM (1994) que defendia a utilização de análises fenotípicas para se discriminar linhagens de diferentes espécies.

De acordo com COSTAS *et al.*(1989), que analisaram 50 linhagens de *S.aureus*, dentre elas 41 resistentes à meticilina (MRSA), a técnica de SDS-PAGE de proteínas totais juntamente com análise numérica computacional consiste num critério adicional ao estudo epidemiológico e evolutivo de MRSA.

Um exemplo da aplicação deste método está descrito no trabalho de LEE e BURNIE (1988) que ao estudarem 133 isolados de *S.aureus* resistentes à meticilina (MRSA), através da técnica de *immunoblotting*, conseguiram obter seus respectivos *fingerprints*, confirmando as linhagens epidêmicas e

agrupando as restantes em sete grupos distintos mediante resultados de fagotipagem e antibiogramas.

Embora a análise de proteínas através da comparação dos perfis eletroforéticos apresente uma série de vantagens (rapidez, facilidade, reprodutibilidade), quando se trata de estudos de sistemática bacteriana, esta técnica tem sido utilizada em conjunto com técnicas tradicionais de taxonomia.

2. 6. 2. Análise de DNA

O sequenciamento do genoma inteiro de uma bactéria é uma prática inviável mesmo pelas modernas técnicas de análise de DNA atualmente disponíveis. O que normalmente se utiliza é a comparação dos genomas bacterianos entre si, onde o DNA de uma bactéria desconhecida é disposta de maneira que o DNA da bactéria de referência possa ser pareado e a homologia entre os DNAs calculada. Porém, os resultados obtidos nem sempre permitem afirmar a distinção entre algumas espécies.

Segundo VAN BELKUM (1994), uma série de técnicas de biologia molecular vêm sendo descritas na literatura no sentido de melhor elucidar investigações epidemiológicas. Essas técnicas moleculares conduzem a uma maior rapidez e confiabilidade nos resultados, permitindo uma detecção fácil e segura do microrganismo sob investigação.

Muitas metodologias envolvendo *S.aureus* já foram reportadas, entre elas, PREVOST *et al.* (1992) estudaram 239 linhagens de *S.aureus* resistentes à meticilina (MRSA) provenientes de 142 pacientes e ao utilizarem a técnica de eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) obtiveram 26 *fingerprints* diferentes, contrariando os resultados obtidos com ribotipagem, que não permitiram distinção entre linhagens, levando os pesquisadores a sugerirem que PFGE seria um método mais efetivo, no que diz respeito ao estudo epidemiológico de linhagens MRSA.

MATTHEWS *et al.* (1992) ao estudarem espécies de *Staphylococcus* de origem bovina, realizaram a análise do perfil plasmidial destas linhagens com a finalidade de identificação, mas concluíram não tratar-se de um método adequado para este fim.

NOTERMANS *et al.* (1988) utilizaram 3 diferentes sondas sintéticas para hibridização de DNA visando a detecção de linhagens de *S.aureus* enterotoxigênicas produtoras de EEB e EEC. Das 210 linhagens estudadas, ambas as linhagens produtoras de EEB (21) e EEC (69) foram identificadas com a utilização de apenas uma das três sondas.

No Brasil, BRANCHINI *et al.* (1993) estudaram linhagens de MRSA provenientes de dois hospitais de São Paulo e após seus experimentos

observaram que, com a aplicação de eletroforese de DNA em gel de campo pulsado juntamente com a técnica de análise plasmidial com enzimas de restrição (REAP) permitem a caracterização destas linhagens.

O surgimento de uma nova técnica molecular, denominada Reação em Cadeia por Polimerase (PCR) tem revolucionado o estudo da genética dos microrganismos, sendo considerada um marco para a biologia molecular (COUTINHO *et al.*, 1993). PCR consiste numa reação enzimática em cadeia que durante vários ciclos, duplica fitas complementares da sequência alvo do DNA. Esta reação utiliza *primers* (oligonucleotídeos sintéticos) complementares à pequena sequência, em fitas opostas, que flanqueiam o DNA *target* (alvo). O ciclo padrão de PCR consiste de : 1) aquecimento próximo a temperatura de ebulição, para desnaturação do DNA molde (94°C) ; 2) resfriamento para permitir o anelamento dos *primers* às sequências do DNA molde (34 °C) ; 3) aquecimento moderado permitindo a extensão dos *primers* anelados pela ação da uma enzima DNA polimerase termo-estável duplicando o DNA alvo (72°C) ; e 4) desnaturação do duplexes recém-formados, retornando então a primeira etapa do ciclo. A sequência de DNA alvo é duplicada desta forma a cada ciclo. A amplificação prossegue exponencialmente, chegando-se a 1 milhão de vezes após o vigésimo ciclo. Cada ciclo tem duração de 3 a 5 minutos e, é repetido de 30 a 40 vezes. O procedimento completo é finalizado em 2 a 4 horas (BROCK & MADIGAN, 1991).

A obtenção de uma DNA polimerase termo-estável (95 °C), extraída de uma bactéria termofílica *Thermus aquaticus*, denominada de **Taq polimerase** (SAIKI *et al.*, 1988) e o desenvolvimento de equipamentos automáticos de PCR têm facilitado a introdução desta técnica nos laboratórios, bem como aumentado suas aplicações (VAN BELKUM, 1994), não só pela rapidez, como pela facilidade de realização.

Os produtos obtidos da amplificação são separados por eletroforese em géis de agarose (GIOVANNONI, 1991). Este processo tem como resultado um padrão de bandas semelhantes à um código de barras. A esse código damos o nome de *fingerprints* (impressões digitais) da bactéria, que possibilitam não só caracterizar como diferenciar espécies ou estirpes diferentes, pelo número e tamanho dos fragmentos amplificados (COUTINHO *et al.*, 1993 ; MATTHEWS e OLIVER, 1994).

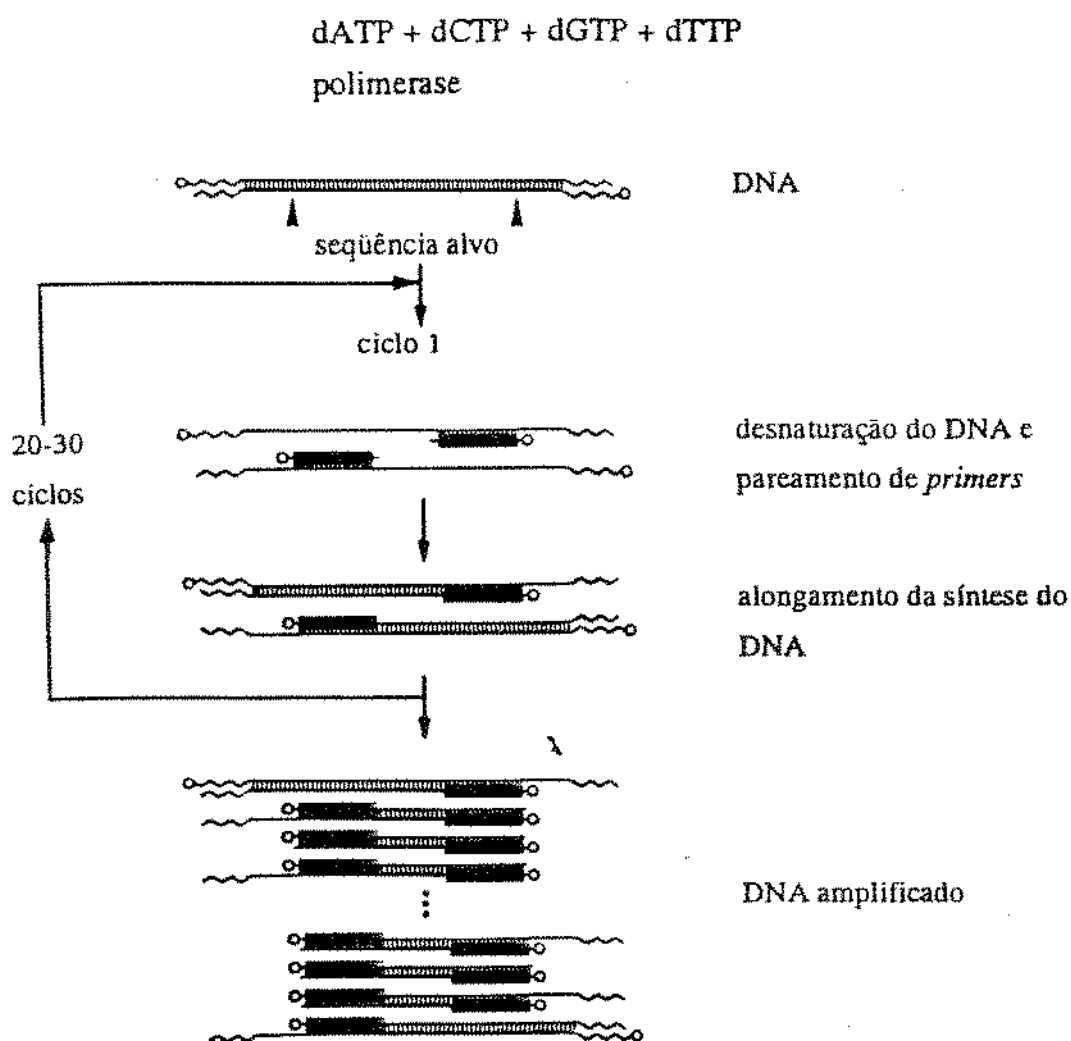


Figura 1 - Representação simplificada da Reação em Cadeia por Polimerase (PCR). (), *primer* ; (), DNA amplificado no mínimo 10^5 vezes ao original (KAJI, 1993).

A reação de PCR também oferece a possibilidade da rápida identificação de bactérias, bem como sua detecção em alimentos, como reportado por FACH *et al.* (1993) em trabalho desenvolvido com linhagens de *Clostridium botulinum* produtoras de toxina A, responsáveis pelo botulismo humano.

NIEDERHAUSER *et al.* (1992) através da utilização do PCR conseguiram detectar a presença de *Listeria monocytogenes* em alimentos artificialmente contaminados com apenas 10 bactérias em cada 10g.

De acordo com WILSON *et al.* (1991) é possível detectar *Staphylococcus aureus* enterotoxigênicos em leite com a utilização desta nova técnica molecular, e também amplificar e detectar seus genes toxigênicos. Outro trabalho, envolvendo este microrganismo, afirma a possibilidade de sua detecção quando presente apenas em 10^0 - 10^1 células / grama de alimento não havendo evidência de interferência da microflora contaminante natural (TSEN e CHENG, 1992).

Estudos epidemiológicos clínicos desenvolvidos sobre *S.aureus* resistentes à meticilina (MRSA) utilizaram PCR com sucesso (MURAKAMI *et al.*, 1991 ; ÜNAL *et al.*, 1992).

A obtenção de *fingerprints* de DNA de *S.aureus* de origem bovina através do PCR foi objetivo atingido por MATTHEWS *et al.* (1994). Em concordância, BELKUM *et al.* (1993) não só obtiveram *fingerprints* de DNA de *S.aureus* (MRSA) com a mesma técnica molecular, como também confirmaram seus resultados com a tradicional fagotipagem.

Recentemente, uma nova técnica de *fingerprinting* de DNA denominada RAPD - Random Amplified Polymorphic DNA, foi descrita (WELSH e Mc CLELLAND, 1990 ; WILLIAMS *et al.*, 1990) e tem sido amplamente utilizada. A técnica, uma variante da metodologia tradicional de PCR, utiliza pequenos *primers* únicos de sequência arbitrária para amplificar DNA genômico, sem requerer conhecimento prévio da sequência do DNA a ser amplificado (WILLIAMS *et al.*, 1990). Os perfis dos produtos obtidos na amplificação, após a separação eletroforética, podem ser usados como *fingerprints* de linhagens de vários microrganismos tanto procariontes como eucariontes (CANCILLA *et al.*, 1992 ; MAZURIER *et al.*, 1992 ; MYERS *et*

al., 1993), permitindo discriminação entre elas (LAWRENCE *et al.*, 1993). Assim sendo, a técnica de RAPD vem proporcionando uma nova estratégia para metodologia na caracterização de microrganismos (STEPHAN *et al.*, 1994).

WILLIAMS *et al.* (1990) mostraram que *primers*, compostos por 10 nucleotídeos de sequência arbitrária, podem ser usados para a obtenção de *fingerprints* através da Reação em Cadeia por Polimerase (PCR).

Outra característica importante do RAPD, além de sua rapidez e simplicidade (SAULNIER *et al.*, 1993), consiste no fato de que mínimas alterações na sequência dos *primers* ou nas condições de amplificação podem resultar em dramáticas mudanças nos perfis a serem obtidos (PREVOST *et al.*, 1992).

STEPHAN *et al.* (1994) caracterizou *Bacillus licheniformis* com o emprego da técnica de RAPD utilizando 2 *primers* compostos de 10 nucleotídeos. *Bacillus thuringiensis* também foi identificado e diferenciado de *Bacillus cereus* através da utilização desta nova técnica molecular em estudos desenvolvidos por BROUSSEAU *et al.* (1993).

Fingerprints de isolados de *Yersinia enterocolitica* obtidos pelo ensaio de RAPD permitiram RASMUSSEN *et al.* (1994) discriminarem linhagens patogênicas das não - patogênicas.

LAWRENCE *et al.* (1993) empregaram um *primer* (10 nucleotídeos) no estudo de 91 linhagens de *Listeria monocytogenes* e, através dos *fingerprints* obtidos por RAPD, sugeriram um sorotipo que seria o mais frequente em linhagens provenientes de alimentos.

Estudos com o gênero *Staphylococcus*, envolvendo esta nova técnica de biologia molecular, também foram reportados. Ao estudarem isolados de *Staphylococcus haemolyticus*, provenientes de doentes apresentando quadro clínico de peritonite, YOUNG *et al.* (1994) conseguiram discriminar linhagens anteriormente indistinguíveis. Já SAULNIER *et al.* (1993) obtiveram os *fingerprints* de 26 linhagens de *S.aureus* resistentes à meticilina (MRSA) através de RAPD e eletroforese em gel de campo pulsado, e ao

compararem os resultados obtidos concluíram que este último consiste no melhor método para a caracterização de MRSA.

A utilização da metodologia de RAPD para gerar *fingerprints* de DNA de origem bacteriana, viral, fúngica, vegetal e animal (CAETANO-ANOLLÉS *et al.*, 1991) tem sido reportada.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Linhagens de *S.aureus*

Foram utilizadas 22 linhagens selvagens de *S.aureus* isoladas no Laboratório de Microbiologia da FEA / UNICAMP provenientes de leite cru e presunto.

Como linhagens-padrão produtoras de enterotoxina foram utilizadas as linhagens: 772 (EEA), S6 (EEB), 1230 (EEC) e 1151 (EED), fornecidas pelo "Food Research Institute"- FRI, University of Wisconsin, Madison, USA.

As designações e procedências das linhagens de referência e das linhagens selvagens utilizadas neste trabalho estão indicadas na Tabela 2.

As linhagens foram mantidas em meio BHI (Brain Heart Infusion, Difco) sólido (1,5% ágar) na geladeira.

As linhagens utilizadas neste trabalho provenientes de leite cru (17) foram gentilmente cedidas pela doutoranda Ana Maria de Oliveira. As demais linhagens (5), provenientes de presunto, foram fornecidas pelo Laboratório de Microbiologia (FEA-UNICAMP).

Todas as linhagens utilizadas neste trabalho já haviam sido caracterizadas quanto ao seu comportamento morfológico (Gram), bioquímico (catalase, coagulase e TNase) e sorológico (toxinas).

A caracterização das linhagens selvagens utilizadas neste trabalho estão indicadas na Tabela 3.

TABELA 2 - Procedência das linhagens de *S.aureus*.

nº	linhagens	designação neste trabalho	procedência - origem
1	<i>S.aureus</i> 772 (EEA - padrão)	A	FRI (Wisconsin,EUA)
2	<i>S.aureus</i> S6 (EEB - padrão)	B	FRI (Wisconsin,EUA)
3	<i>S.aureus</i> 1230 (EEC - padrão)	C	FRI (Wisconsin,EUA)
4	<i>S.aureus</i> 1151 (EED - padrão)	D	FRI (Wisconsin,EUA)
5	<i>S.aureus</i> (EEA - selvagem)	A1	Lab. Microbiol. (UNICAMP)
6	<i>S.aureus</i> (EEA - selvagem)	A2	Lab. Microbiol. (UNICAMP)
7	<i>S.aureus</i> (EEA - selvagem)	A3	Lab. Microbiol. (UNICAMP)
8	<i>S.aureus</i> (EEA - selvagem)	A4	Lab. Microbiol. (UNICAMP)
9	<i>S.aureus</i> (EEA - selvagem)	A5	Lab. Microbiol. (UNICAMP)
10	<i>S.aureus</i> (EEA - selvagem)	A6	Lab. Microbiol. (UNICAMP)
11	<i>S.aureus</i> (EEB - selvagem)	B1	Lab. Microbiol. (UNICAMP)
12	<i>S.aureus</i> (EEB - selvagem)	B2	Lab. Microbiol. (UNICAMP)
13	<i>S.aureus</i> (EEB - selvagem)	B3	Lab. Microbiol. (UNICAMP)
14	<i>S.aureus</i> (EEB - selvagem)	B4	Lab. Microbiol. (UNICAMP)
15	<i>S.aureus</i> (EEC - selvagem)	C1	Lab. Microbiol. (UNICAMP)
16	<i>S.aureus</i> (EEC - selvagem)	C2	Lab. Microbiol. (UNICAMP)
17	<i>S.aureus</i> (EEC - selvagem)	C3	Lab. Microbiol. (UNICAMP)
18	<i>S.aureus</i> (EEC - selvagem)	C4	Lab. Microbiol. (UNICAMP)
19	<i>S.aureus</i> (EEC - selvagem)	C5	Lab. Microbiol. (UNICAMP)
20	<i>S.aureus</i> (EEC - selvagem)	C6	Lab. Microbiol. (UNICAMP)
21	<i>S.aureus</i> (EED - selvagem)	D1	Lab. Microbiol. (UNICAMP)
22	<i>S.aureus</i> (EED - selvagem)	D2	Lab. Microbiol. (UNICAMP)
23	<i>S.aureus</i> (EED - selvagem)	D3	Lab. Microbiol. (UNICAMP)
24	<i>S.aureus</i> (EED - selvagem)	D4	Lab. Microbiol. (UNICAMP)
25	<i>S.aureus</i> (EED - selvagem)	D5	Lab. Microbiol. (UNICAMP)
26	<i>S.aureus</i> (EED - selvagem)	D6	Lab. Microbiol. (UNICAMP)

Observação : Todas as linhagens selvagens foram provenientes de leite cru, com exceção das linhagens C2, C3, C4, C5 e C6 provenientes de presunto.

TABELA 3 - Caracterização das linhagens selvagens utilizadas.

Linhagens (*)	Testes			
	Gram	Catalase	Coagulase (**)	TNAse (***)
A1	+	+	-	+
A2	+	+	+	+
A3	+	+	-	+
A4	+	+	-	+
A5	+	+	+	+
A6	+	+	-	+
B1	+	+	-	+
B2	+	+	-	+
B3	+	+	-	+
B4	+	+	-	+
C1	+	+	+	+
C2	+	+	+	+
C3	+	+	+	+
C4	+	+	+	+
C5	+	+	+	+
C6	+	+	+	+
D1	+	+	+	+
D2	+	+	+	+
D3	+	+	+	+
D4	+	+	-	+
D5	+	+	+	+
D6	+	+	+	+

* Toxinas detectadas pelo método de Ouchterlony modificado.
ROBBINS (1974)

** BAER (1981)

*** BENNETT (1971)

3.2. Meios de cultura

- Meio de enriquecimento : Infusão de cérebro e coração (BHI, Difco).
- Meio diferencial e seletivo (Baird - Parker ,Difco), adicionado de telurito de potássio (1%) e gema de ovo (5%).

3.3. Extração e Purificação do DNA cromossômico

O DNA cromossômico foi extraído de acordo com a metodologia de MATTHEWS *et al.* (1994) com algumas modificações.

O crescimento da bactéria *Staphylococcus aureus* foi feito em tubos de ensaio contendo 5 ml de meio BHI (Brain Heart Infusion). A incubação foi feita a 37°C por 5-6 horas (D.O.= 0,7). As culturas foram transferidas para tubos tipo *Eppendorf* e centrifugadas por 3 minutos a 12.000 rpm em uma microcentrífuga, sendo o sobrenadante descartado.As células foram suspendidas em 500µl de solução TE (Tris-HCl 10mM, pH 8,0 e EDTA 1mM) e lisozima (2 mg/ml). A lise das células foi feita primeiramente a 37°C por 45 minutos e posteriormente com adição de 25 µl de Tris-HCl (100mM, pH 8,0), 50µl de EDTA (0,5 M, pH 8,0), 15 µl de NaCl 5M, 10µl de SDS (dodecil sulfato de sódio) 10% e 4,5 µl de proteinase K (20mg/ml) a 50°C até o clareamento da suspensão acima (aproximadamente 1 hora).

A purificação do DNA foi feita através de duas extrações fenol:clorofórmio (1:1) na suspensão de células lisadas. A fase orgânica foi descartada e à fase aquosa foi realizada nova extração com clorofórmio na proporção de 1:1. A solução foi armazenada a -20°C.

3.4. Diálise do DNA cromossômico

A solução contendo DNA foi colocada cuidadosamente, com ponteiras cortadas, em pequenas membranas de diálise e foram dialisadas contra tampão TE (Tris-HCl 10mM, pH 8,0 e EDTA 1mM) por 36 horas. O tampão foi trocado a cada 24 horas. Em seguida, o material foi concentrado com polietilenoglicol (PEG, 6.000).

O preparo das membranas de diálise foi realizado de acordo com SAMBROOK *et al.*, 1989.

3.5. Quantificação do DNA cromossômico

A quantificação do DNA foi feita por comparação com padrões de DNA de concentração conhecida do fago λ .

Uma alíquota de 5 μ l de DNA dialisado foi cuidadosamente transferida para um tubo de microcentrífuga tipo *Eppendorf*, onde adicionou-se 2 μ l de solução corante (glicerol 25%, SDS 1%, azul de bromofenol 0,25%, xileno cianol 0,25% e EDTA 150mM, pH 8,0). Em seguida a alíquota foi aplicada em gel de agarose 0,8%, solidificado em molde acrílico com 30 canaletas, juntamente com um marcador-padrão de concentração conhecida de DNA do fago λ . A solução tampão utilizada para a eletroforese foi TAE (TRIS - acetato 4,0 mM, EDTA 1mM, pH 8,0). A eletroforese foi feita a 100 V. Posteriormente, o gel foi imerso em solução tampão TAE contendo brometo de etídio (5 μ g/ml) por 30 minutos, sendo o excesso removido por lavagem do gel em água destilada. Em seguida, o DNA foi visualizado através de um transiluminador (luz U.V.), e finalmente teve sua concentração obtida através da comparação com o DNA de concentração conhecida.

3.6. RAPD por Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A metodologia foi a descrita por MATTHEWS *et al.* (1994) com algumas modificações.

A amplificação do DNA foi feita num volume total de 25 μ l em tubo de microcentrífuga tipo *Eppendorf* (500 μ l), contendo 30 ng de DNA *template*, 15 μ M de primer, 100 μ M de cada nucleotídeo (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 1 unidade de enzima *Taq* polimerase (Pharmacia) , 2,5 μ l (10% do volume final) de Tampão (*Taq*), 4 μ M finais de $MgCl_2$ e o restante do volume de água

Milli Q (até completar 25µl). A cada reação adicionou-se uma gota de óleo mineral e a amplificação correu 45 ciclos em um DNA Thermal Cycler (Perkin Elmer). Um ciclo consistiu de 1 min a 94°C (desnaturação), 1 min a 34°C (anelamento) e 2 min a 72°C (polimerização). A reação controle foi feita com os mesmos reagentes acima, sem a adição de DNA.

Após o término de cada reação, os produtos da amplificação foram armazenados a -20°C até que fosse realizada a eletroforese deste material.

Os primers utilizados nos experimentos de RAPD foram dos *kits* Q (OPQs) e R (OPRs), da Operon Technologies, Inc. Os códigos bem como as composições de bases dos primers estão indicados na Tabela 4.

3.7. Eletroforese do DNA amplificado

A metodologia foi a descrita por MATTHEWS *et al.* (1994) com algumas modificações.

Um volume de 12 µl da mistura obtida pela reação em cadeia da polimerase (PCR) foi transferido para tubos de microcentrífuga tipo *Eppendorf* contendo solução corante (glicerol 25%, SDS 1%, azul de bromofenol 0,25%, xileno cianol 0,25% e EDTA 150mM, pH 8,0) e aplicados em gel de agarose 1%, solidificado em molde acrílico com 30 canaletas, em tampão TAE (Tris - acetato 4,0 mM, EDTA 1mM, pH 8,0). A eletroforese foi feita em tampão TAE durante aproximadamente uma hora a 100 V, o que significa dizer que houve migração dos produtos de RAPD por 35mm no gel. Posteriormente, o gel foi imerso em tampão TAE contendo brometo de etídio (5 µg/ml) por 30 minutos, sendo o excesso removido por lavagem do gel em água destilada. Em seguida, o DNA foi visualizado através de um transiluminador (luz U.V.) acoplado a uma máquina fotográfica Polaroid modelo MP4+, e fotografado com filme Polaroid tipo 667. Também foi aplicado no gel um marcador de peso molecular (*ladder* de 1 kb, Gibco, BRL).

TABELA 4 - *Primers* utilizados nas reações de RAPD.

Código do <i>primer</i>	Composição de bases (5' - 3')
OPQ1	GGGACGATGG
OPQ2	TCTGTCGGTC
OPQ3	GGTCACCTCA
OPQ4	AGTGCGCTGA
OPQ5	CCGCGTCTTG
OPQ6	GAGCGCCTTG
OPQ7	CCCCGATGGT
OPQ8	CTCCAGCGGA
OPQ9	GGCTAACCGA
OPQ10	TGTGCCCGAA
OPQ11	TCTCCGCAAC
OPQ12	AGTAGGGGCAC
OPQ13	GGAGTGGACA
OPQ14	GGACGCTTCA
OPQ15	GGGTAACGTG

TABELA 4 - Continuação.

Código do <i>primer</i>	Composição de bases (5' - 3')
OPR1	TGCGGGTCCT
OPR2	CACAGCTGCC
OPR3	ACACAGAGGG
OPR4	CCCGTAGCAC
OPR5	GACCTAGTGG
OPR6	GTCTACGGCA
OPR7	ACTGGCCTGA
OPR8	CCCGTTGCCT

Em negrito, *primers* utilizados para análise.

3.8. Análise dos perfis dos produtos de RAPD

Cada gel teve suas bandas analisadas visualmente, onde matrizes foram construídas atribuindo-se 1 para presença de banda em uma dada altura do gel e 0 para ausência. Uma matriz de leitura foi analisada para os géis de RAPD, referente ao somatório de todas as bandas obtidas.

Posteriormente, as matrizes de leitura foram analisadas pelo software NTSYS (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, versão 0.0), que gerou matrizes de similaridade utilizando o coeficiente de Jaccard (PRIEST *et al.*, 1994). Em seguida, o dendrograma foi elaborado, a partir da matriz de similaridade, utilizando o procedimento UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Mean).

3.9. Extração de proteínas totais de *S.aureus*

As proteínas totais foram extraídas de acordo com a metodologia proposta por LAEMMLI (1970).

Após cultivo das bactérias em meio Baird-Parker, por 48 horas, a massa celular foi raspada com o auxílio de uma alça, transferida para tubo de microcentrífuga tipo *Eppendorf* e suspendida com solução tampão de lise (Tris-HCl 62,5mM, pH 6,8, SDS 2%, β -mercaptoetanol 5% e glicerol 20%) e aquecida a 100°C por 15 minutos. A relação entre volume de tampão e a massa das bactérias foi de 90 μ l de tampão : 20mg de bactéria . Após o resfriamento da suspensão das células à temperatura ambiente, a mesma foi centrifugada a 10.000 rpm em uma microcentrífuga por 15 minutos. O sobrenadante foi recuperado e armazenado a -20 °C para posterior análise por eletroforese. Foram aplicados no gel de 7 a 10 μ l de cada amostra, variando de acordo com a concentração de cada uma após visualização da intensidade de bandas.

3.10. Preparo dos géis de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE)

As soluções e reagentes utilizados para o preparo do gel de separação SDS-PAGE 10% e gel de empacotamento SDS-PAGE 4% de 1,5 mm de espessura e respectivos volumes estão indicados na Tabela 5.

TABELA 5 - Volume das soluções estoques utilizados no preparo dos géis

solução estoque	gel de separação	gel de empacotamento
acrilamida 30% e bis acrilamida 0,8%	5,0 ml	0,9 ml
TRIS - HCl (1,5M pH 8,8)	5,9 ml	-----
TRIS - HCl (0,5M pH 6,8)	-----	0,9 ml
água destilada	3,6 ml	4,8 ml
SDS 10%	150 µl	75 µl
persulfato de amônio 2,5%	0,75 ml	0,35 ml
TEMED	20 µl	20 µl

Volume calculado para o preparo de um gel de separação e um gel de empacotamento. Todas as soluções foram estocadas a 4°C, exceto persulfato de amônio, que era preparado no momento do preparo dos géis e SDS, mantido à temperatura ambiente. SDS, dodecil sulfato de sódio ; TEMED, N, N, N', N' - tetrametiletilenodiamino; Tris - HCl , solução de trizma base com pH ajustado com HCl.

Primeiramente, foi preparado o gel de separação 10% com a adição das soluções na sequência indicada na Tabela 5. As soluções de acrilamida / bis, Tris-HCl pH 8,8 e água foram colocadas em um béquer de 100ml e homogeneizadas com lenta agitação. Posteriormente, foi acrescentado solução SDS, o iniciador (persulfato de amônio) e o catalizador da reação (TEMED) na mistura acima. Imediatamente esta foi transferida para o sistema das placas de vidro, anteriormente montado com espaçadores de *teflon*. Em seguida, foi colocado delicadamente 2ml de água destilada com a finalidade de delinear o gel e evitar o contato com o oxigênio, inibidor da polimerização. Após a polimerização do gel, a água foi retirada e o espaço remanescente lavado com água destilada e delicadamente seco com papel de filtro.

O gel de empacotamento foi preparado da mesma maneira descrita para o outro gel. A mistura líquida do gel de empacotamento foi despejada sobre o gel de separação e sobre esta uma barra de *teflon* com 10 canaletas para formação de espaços vazios para subsequente aplicação da amostra. A polimerização do gel foi feita à temperatura ambiente por 30 minutos. Decorrido este tempo, a barra de *teflon* foi retirada.

3.11. Eletroforese de proteínas totais em gel de poliacrilamida contendo SDS

As placas de vidro contendo os géis foram transferidas para a cuba acrílica de eletroforese. Esta foi preenchida com solução tampão (Tris-HCl 0,025M pH 8,3, glicina 0,192M e SDS 1%), nos reservatórios superior e inferior. Com o auxílio de uma seringa plástica foram retiradas bolhas de ar que por ventura se formavam entre as placas na parte inferior. As amostras foram aplicadas nas canaletas formadas no gel de empacotamento e submetidas a 70V até atingirem os géis de separação. A partir daí, a corrida eletroforética foi realizada à temperatura ambiente a 140V. O padrão de proteínas de peso molecular relativo (M_r) conhecido foi adquirido da *Sigma Chemical Company* contendo: albumina de plasma bovino (66.0 kDa), albumina de ovo (45.0 kDa), desidrogenase gliceraldeído-3 fosfato de músculo de coelho (36.0 kDa), anidrase carbônica (29.0 kDa), tripsinogênio (24.0 kDa), inibidor de tripsina (20.1 kDa) e α -lactoalbumina de leite bovino (14.2 kDa).

3.12. Coloração de proteínas por impregnação por prata

A coloração das proteínas foi efetuada conforme a metodologia descrita por BLUM et al. (1987) com algumas modificações (Luiz Otávio Beriam - Inst. Biológico, comunicação pessoal).

Após a corrida eletroforética, o gel foi transferido para uma cuba de vidro onde foi fixado e revelado através de uma série de etapas em soluções e tempo cronometrados conforme indicado na Tabela 6.

Em todas as etapas o tempo foi controlado exatamente para a reprodutibilidade das bandas, com exceção apenas na etapa da revelação na qual o tempo foi dependente da visualização desejada das bandas (aproximadamente 15 minutos).

A secagem do gel foi realizada entre dois papéis de celofane previamente umedecidos com água à temperatura ambiente. Em seguida, o gel foi fotografado.

3.13. Análise dos géis SDS - PAGE

Os perfis eletroforéticos das proteínas totais das células foram analisados visualmente quanto a presença ou ausência de algumas bandas em uma determinada altura e as linhagens similares agrupadas num mesmo gel. Nessa análise, apenas algumas bandas foram consideradas. As bandas em questão foram selecionadas subjetivamente devido à nitidez, a reprodutibilidade, a facilidade de visualização. Posteriormente, a confirmação destes agrupamentos se deu mediante a análise de cada gel pelo densitômetro de varredura (Ultroscan XL; Pharmacia - LKB Biotechnology, Sweden).

Em seguida, o gel contendo o extrato das linhagens de referência (A, B, C e D) e algumas linhagens selvagens (Figura 13) foi escaneado e examinado pelo programa computacional Gel Manager for Windows (BioSystematica, Prague), que permitiu a elaboração do dendrograma correspondente a partir da matriz de similaridade gerada.

TABELA 6 - Sequência de tratamento do gel de poliacrilamida para a coloração de proteínas com prata.

Soluções	Tempo de tratamento
Fixadora (etanol 50%, ác.acético 12% e 75ml/l de formaldeído 37%)	> 1 h
Etanol 50%	3 x 20 min
Solução de pré-tratamento (tiosulfato de sódio 0,02%)	1 min
Água destilada	3 x 20 s
Solução de impregnação (nitrato de prata 0,2% e 75ml/l de formaldeído 37%)	20 min
Água destilada	2 x 20 s
Solução reveladora (carbonato de sódio 6%, tiosulfato de sódio 0,04% e 50 ml/l de formaldeído 37%)	até o aparecimento das bandas
Água destilada	2 x 20 s
Solução de bloqueio (etanol 50%, ác. acético 12% e 75ml/l de formaldeído 37%)	10 min

O volume de cada solução preparada foi de 100ml.
Todas as etapas ocorreram sob agitação.

4. RESULTADOS

4. 1. Perfil de fragmentos de DNA gerados por RAPD.

Com a finalidade de verificar a similaridade entre as linhagens de referência e as selvagens, foi realizada a análise de RAPD. Foram utilizados 23 primers para as reações. Deste total, 6 primers (OPQ2, OPQ8, OPQ10, OPQ14, OPQ15 e OPR3) resultaram em ausência total de produtos de amplificação e 12 primers (OPQ3, OPQ4, OPQ5, OPQ7, OPQ9, OPQ11, OPQ13, OPR2, OPR4, OPR6, OPR7 e OPR8) apresentaram apenas algumas bandas para poucas linhagens, sendo portanto esses 18 primers excluídos da análise. Os 5 primers escolhidos foram aqueles que apresentaram padrão de bandas em quase todas as linhagens e compreendem : OPQ1, OPQ6, OPQ12, OPR1 e OPR5.

As bandas analisadas variaram de 0,5 a 4,0 kb. Com o intuito de conferir a reprodutibilidade dos perfis obtidos por RAPD, foram realizadas duas reações para cada primer selecionado, utilizando DNA de mesma extração. Na análise pelo método UPGMA, foram somadas as bandas dos 5 géis para a construção da matriz de similaridade, que acabou sendo composta por 45 linhas e 26 colunas.

Os produtos de amplificação obtidos com os primers OPQ1, OPQ6, OPQ12, OPR1 e OPR5 encontram-se ilustrados nas Figuras 2, 3, 4, 5 e 6, respectivamente.

Todas as linhagens utilizadas apresentaram diferenças no perfil dos produtos de RAPD, indicando a existência de uma grande variabilidade entre as linhagens.

O dendrograma gerado a partir da análise da matriz de similaridade, mostrado na Figura 7, apresenta agrupamento de várias linhagens. As barras verticais à direita indicam os agrupamentos e a barra superior indica a porcentagem de similaridade entre as linhagens.

Com uma similaridade de 70%, constatou-se a formação de 5 agrupamentos. O primeiro compreendeu as linhagens A, C1, A4, A5, B1, B4. Já o segundo e terceiro agrupamentos envolveram A1, C, A2 e B, C4, C6, B3, respectivamente. O quarto, reuniu as linhagens C2 e D1, e por fim o quinto agrupamento associou D2 e D4.

Ao nível de aproximadamente 50% verificou-se a formação de 4 grupos. O maior deles incluiu as linhagens A, C1, A4, A5, B1, B4, A1, C, A2, e A3. O segundo agrupamento envolveu B, C4, C6, B3, C5 e D6. Já o terceiro grupo foi constituído pelas linhagens B2, C2, D1 e C3 e finalmente o último agrupamento reuniu D2, D4 e D5. As linhagens A6, D e D3, apresentaram baixa similaridade com as demais.

Dois grandes sub-grupos foram formados, a um nível de 30% de similaridade. O maior envolveu as linhagens A, C1, A4, A5, B1, B4, A1, C, A2, A3, B, C4, C6, B3, C5 e D6, enquanto o segundo sub-grupo reuniu B2, C2, D1, C3, D2, D4 e D5. A similaridade entre esses dois agrupamentos foi de aproximadamente 20%. Três isolados (A6, D e D3) não foram alocados nesses sub-grupos.

OPQ1

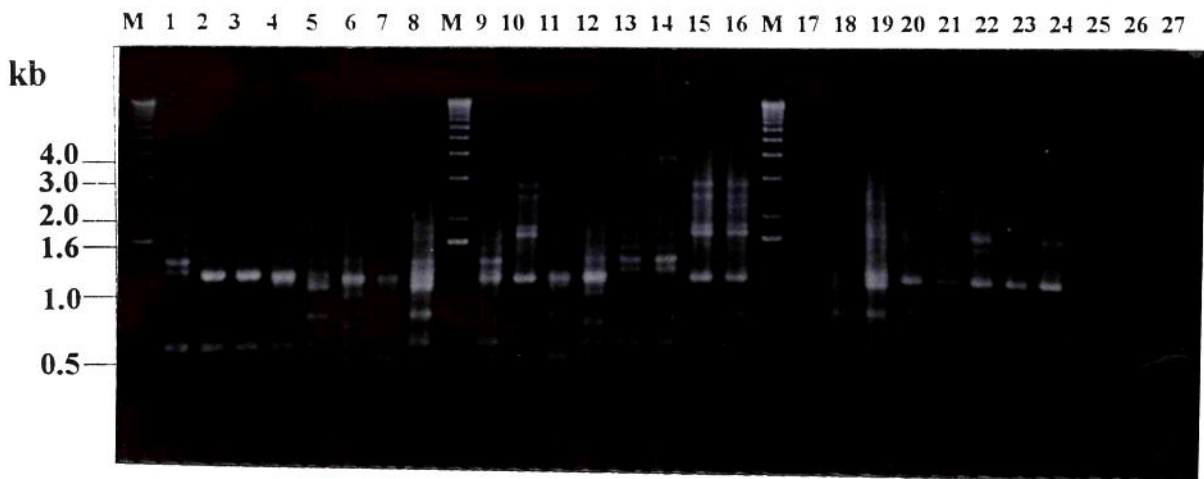


Figura 2 - Eletroforese de produtos de RAPD (OPQ1) das linhagens de *Staphylococcus aureus*. 1 (A), 2 (A1), 3 (A2), 4 (A3), 4 (A3), 5 (A4), 6 (A5), 7 (A6), 8 (B), 9 (B1), 10 (B2), 11 (B3), 12 (B4), 13 (C), 14 (C1), 15 (C2), 16 (C3), 17 (C4), 18 (C5), 19 (C6), 20 (D), 21 (D1), 22 (D2), 23 (D3), 24 (D4), 25 (D5) e 26 (D6). As canaletas M correspondem ao marcador de peso molecular (ladder de 1 kb, Gibco, BRL). A última canaleta (27) refere-se ao controle da reação, sem DNA.

OPQ6

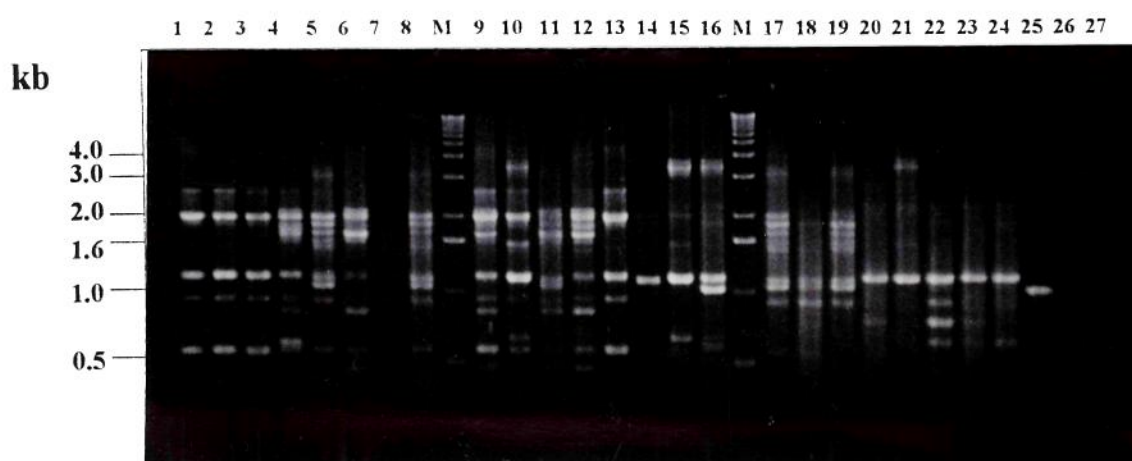


Figura 3 - Eletroforese de produtos de RAPD (OPQ6) das linhagens de *Staphylococcus aureus*. 1 (A), 2 (A1), 3 (A2), 4 (A3), 4 (A3), 5 (A4), 6 (A5), 7 (A6), 8 (B), 9 (B1), 10 (B2), 11 (B3), 12 (B4), 13 (C), 14 (C1), 15 (C2), 16 (C3), 17 (C4), 18 (C5), 19 (C6), 20 (D), 21 (D1), 22 (D2), 23 (D3), 24 (D4), 25 (D5) e 26 (D6). As canaletas M correspondem ao marcador de peso molecular (ladder de 1 kb, Gibco, BRL). A última canaleta (27) refere-se ao controle da reação, sem DNA.

OPQ12

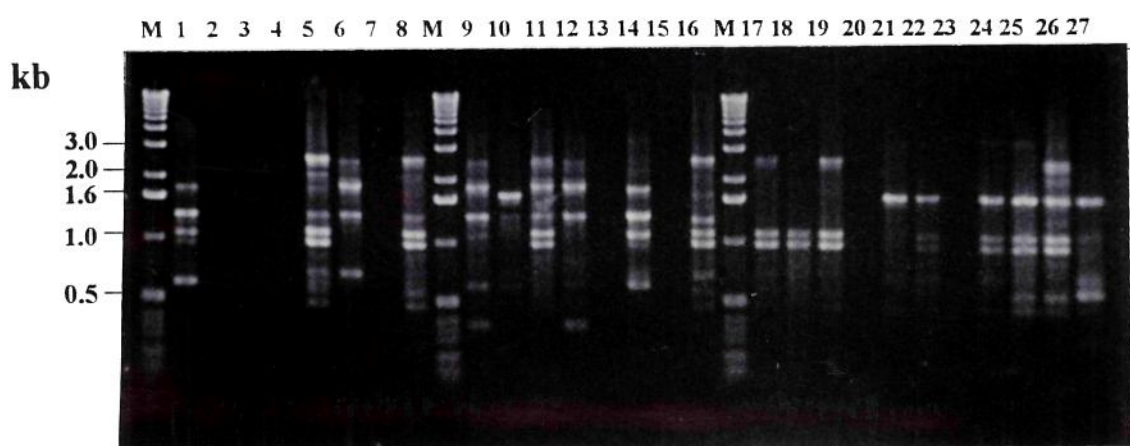


Figura 4 - Eletroforese de produtos de RAPD (OPQ12) das linhagens de *Staphylococcus aureus*. 1 (A), 2 (A1), 3 (A2), 4 (A3), 4 (A3), 5 (A4), 6 (A5), 7 (A6), 8 (B), 9 (B1), 10 (B2), 11 (B3), 12 (B4), 13 (C), 14 (C1), 15 (C2), 16 (C3), 17 (C4), 18 (C5), 19 (C6), 20 (D), 21 (D1), 22 (D2), 23 (D3), 24 (D4), 25 (D5) e 26 (D6). As canaletas M correspondem ao marcador de peso molecular (ladder de 1 kb, Gibco, BRL). A última canaleta (27) refere-se ao controle da reação, sem DNA.

OPR1

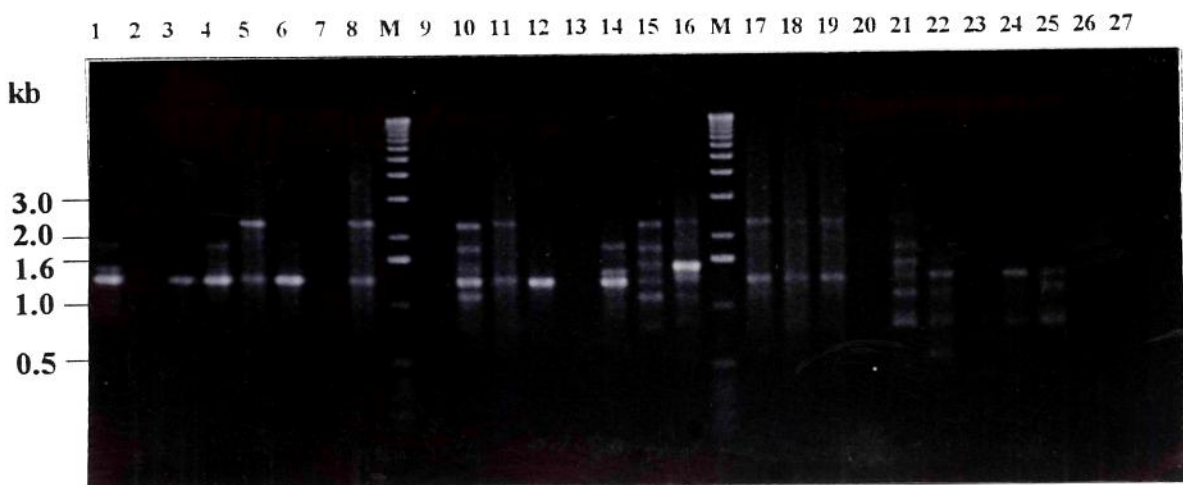


Figura 5 - Eletroforese de produtos de RAPD (OPR1) das linhagens de *Staphylococcus aureus*. 1 (A), 2 (A1), 3 (A2), 4 (A3), 4 (A3), 5 (A4), 6 (A5), 7 (A6), 8 (B), 9 (B1), 10 (B2), 11 (B3), 12 (B4), 13 (C), 14 (C1), 15 (C2), 16 (C3), 17 (C4), 18 (C5), 19 (C6), 20 (D), 21 (D1), 22 (D2), 23 (D3), 24 (D4), 25 (D5) e 26 (D6). As canaletas M correspondem ao marcador de peso molecular (ladder de 1 kb, Gibco, BRL). A última canaleta (27) refere-se ao controle da reação, sem DNA.

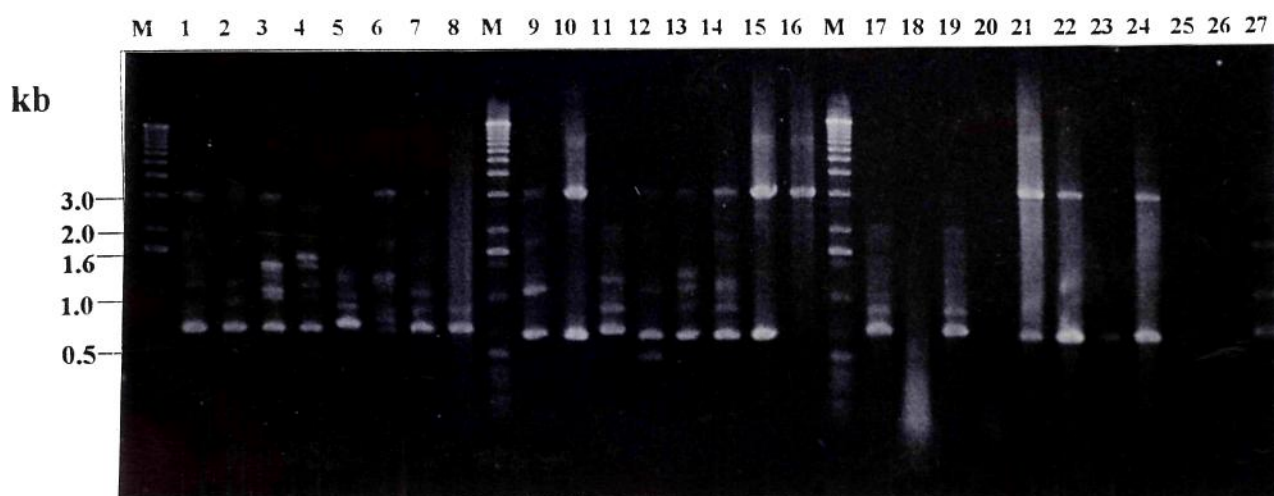


Figura 6 - Eletroforese de produtos de RAPD (OPR5) das linhagens de *Staphylococcus aureus*. 1 (A), 2 (A1), 3 (A2), 4 (A3), 4 (A3), 5 (A4), 6 (A5), 7 (A6), 8 (B), 9 (B1), 10 (B2), 11 (B3), 12 (B4), 13 (C), 14 (C1), 15 (C2), 16 (C3), 17 (C4), 18 (C5), 19 (C6), 20 (D), 21 (D1), 22 (D2), 23 (D3), 24 (D4), 25 (D5) e 26 (D6). As canaletas M correspondem ao marcador de peso molecular (ladder de 1 kb, Gibco, BRL). A última canaleta (27) refere-se ao controle da reação, sem DNA.

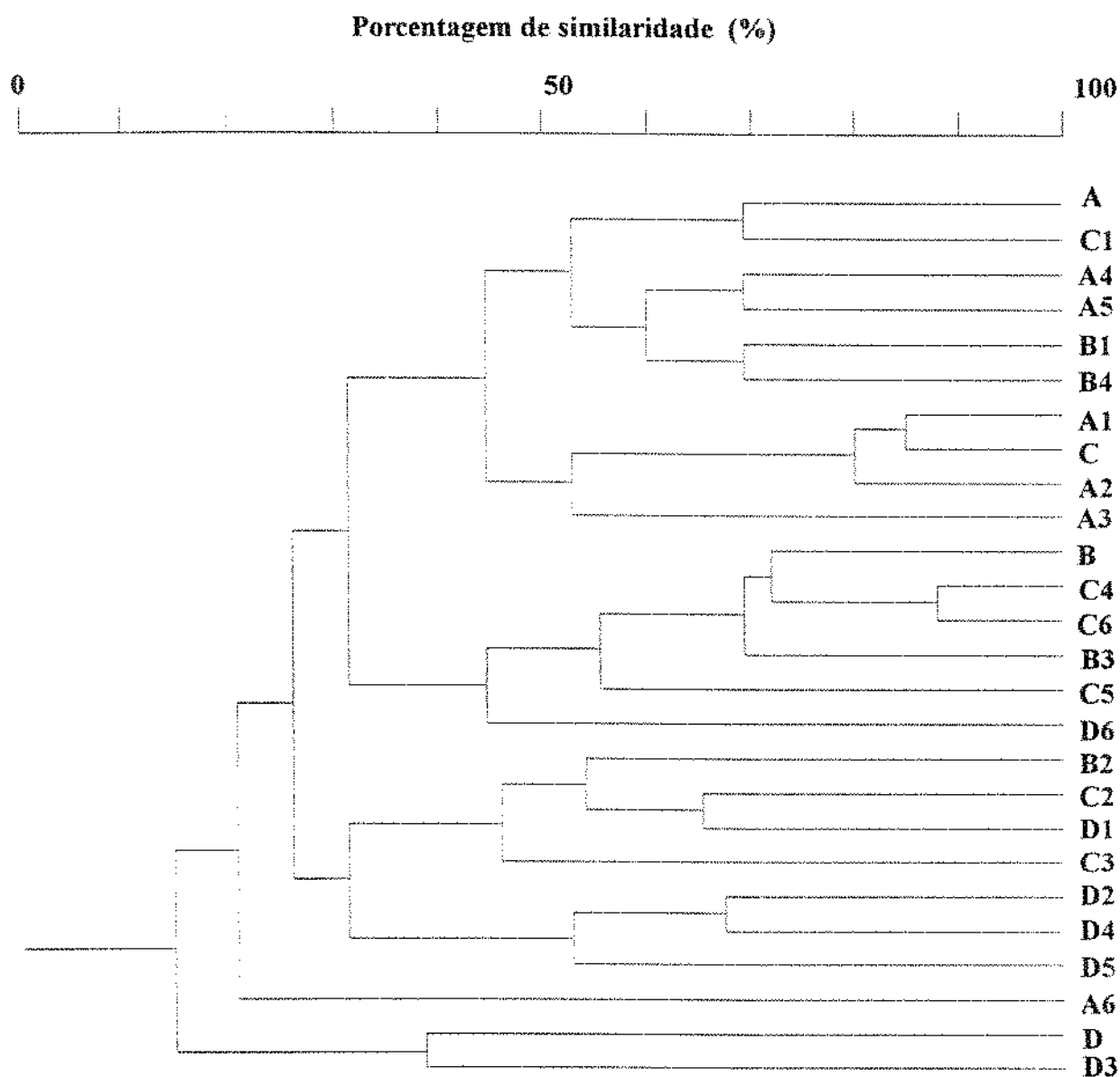


Figura 7 - Dendrograma das linhagens de *Staphylococcus aureus* indicando a porcentagem de similaridade entre os produtos de RAPD e os grupos formados, obtido por análise através do método UPGMA.

4. 2. Perfil eletroforético de proteínas totais.

Com o intuito de constatar diferenças entre as linhagens-padrão produtoras de enterotoxinas com as linhagens selvagens, foi efetuada a análise de proteínas celulares totais em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE).

Primeiramente foi realizado um experimento piloto incluindo todas as linhagens a serem analisadas. De posse dos perfis eletroforéticos de todas as linhagens selecionou-se, através de análise visual, as linhagens com mesmo perfil de bandas.

As letras minúsculas, encontradas nas Figuras 8 a 12, assinalam bandas comuns dessas linhagens.

Numa primeira análise, foi possível agrupar as linhagens A1, A2, A4, C1, C2, D1 e D2, por apresentarem perfil eletroforético similar. A Figura 8 ilustra o perfil dessas linhagens, que apresentou um número de 20 a 30 bandas, com peso molecular variando de 14.2 a 66.0 kDa. Para esta análise, foram consideradas as bandas **a**, **b**, **c** e **d**, de forte intensidade, comuns para estas linhagens.

Embora tenham sido analisadas em outro gel, as linhagens A, C, C4, C5 e C6 também apresentaram perfil eletroforético similar ao das linhagens A1, A2, A4, C1, C2, D1 e D2, com algumas pequenas diferenças que foram desconsideradas. As bandas **a**, **b**, **c** e **d** foram facilmente detectadas também para essas linhagens, conforme mostra a Figura 9.

Um outro agrupamento envolveu as linhagens-padrão B e D, que apresentaram um perfil eletroforético idêntico. Nesta análise foram consideradas as bandas **e**, **f**, **g** e **h**, capazes de diferenciá-las das demais. A Figura 10 ilustra as duas linhagens e suas bandas específicas.

As linhagens B1, B2, B3, B4, A5 e A6 foram analisadas num mesmo gel e foram consideradas muito similares. O perfil das proteínas totais apresentou bandas características para essas linhagens, indicadas pelas letras **i**, **j**, **l** e **m**. Na Figura 11 encontra-se mais este agrupamento.

Embora ilustradas em outra figura, as linhagens C3, D3, D4 e D6 quando comparadas com B1, B2, B3, B4, A5 e A6, também apresentaram perfil eletroforético contendo as mesmas proteínas específicas, sendo portanto consideradas do mesmo agrupamento. O perfil proteico das linhagens C3, D3, D4 e D6 com as bandas específicas assinaladas encontram-se na Figura 12.

Na Figura 13, comprovamos a similaridade entre as linhagens A, C, C2 e C5, entre as padrões B e D, e também entre B4 e D3. As linhagens A3 e D5 por possuírem perfil eletroforético distinto não foram associadas às demais. Com as bandas representadas pelas letras minúsculas (Figuras 8 a 12), pôde-se observar não só a similaridade como a diferenciação entre linhagens.

Com a finalidade de comprovar a relação entre o perfil eletroforético das linhagens, o gel da Figura 12 foi submetido à análise por densitometria. Os traços densitométricos obtidos revelaram a evidente semelhança entre A, C, C2 e C5, entre B e D, entre B4 e D3, e as distintas A3 e D5, como ilustrado na Figura 14.

O dendrograma, elaborado a partir da matriz de similaridade, encontra-se na Figura 15. Nele, foi possível observar a formação de dois grandes sub-grupos, com 90% de similaridade. No primeiro foi verificado o agrupamento das linhagens A, A1, A2, A4, C, C1, C2, C4, C5, C6, D1 e D2. Já o segundo, reuniu as linhagens B, D, A5, A6, B1, B2, B3, B4, C3, D3, D4 e D6. Ao nível de 70%, o primeiro sub-grupo se associa ao segundo, enquanto a linhagem A3 se associa à D5. Todas as linhagens se assemelham ao nível de 50%.

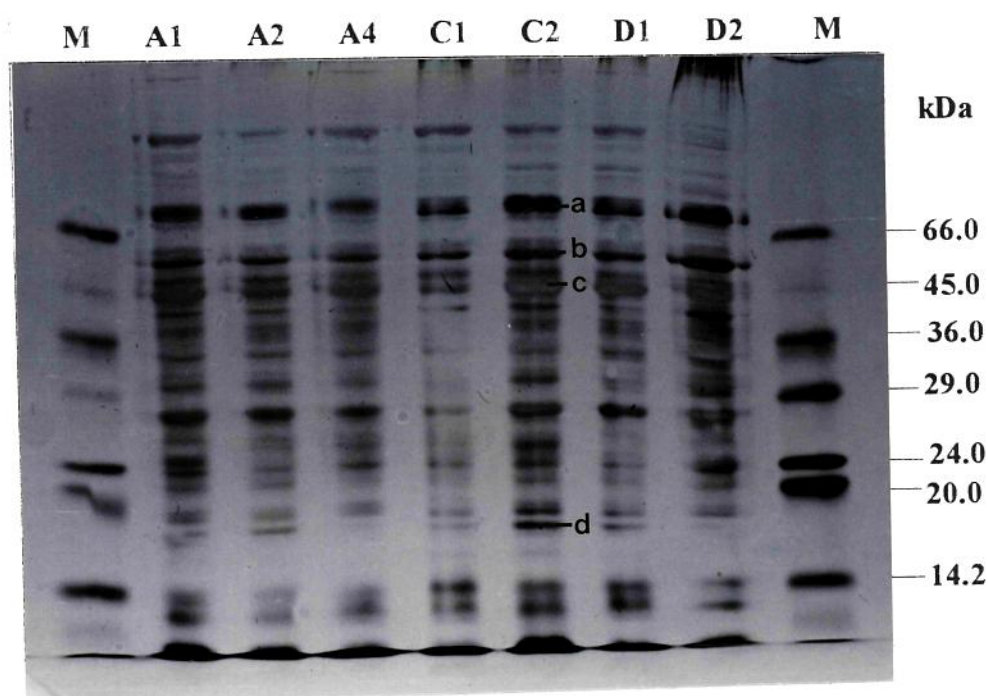


Figura 8 - Eletroforese de proteínas totais das linhagens de *S.aureus*: A1, A2, A4, C1, C2, D1 e D2. A canaleta M refere-se ao padrão de peso molecular contendo : albumina de plasma bovino (66.0 kDa), albumina de ovo (45.0 kDa), desidrogenase gliceraldeído-3 fosfato de músculo de coelho (36.0 kDa), anidrase carbônica (29.0 kDa), tripsinogênio (24.0 kDa), inibidor de tripsina (20.1 kDa) e α -lactoalbumina de leite bovino (14.2 kDa).

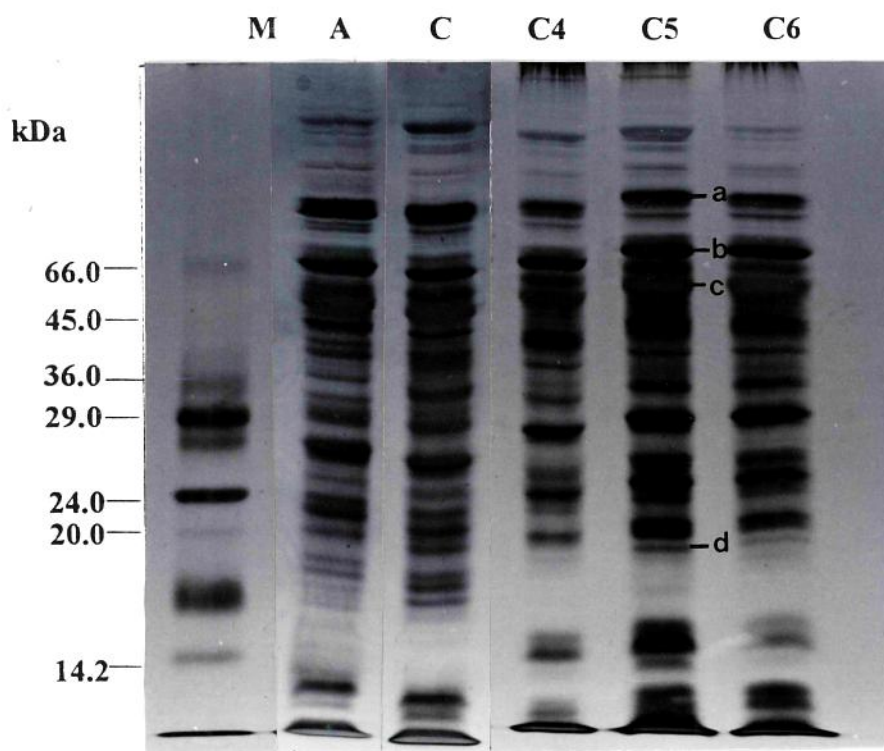


Figura 9 - Eletroforese de proteínas totais das linhagens de *S.aureus*: A, C, C4, C5 e C6. A canaleta M refere-se ao padrão de peso molecular contendo: albumina de plasma bovino (66.0 kDa), albumina de ovo (45.0 kDa), desidrogenase gliceraldeído-3 fosfato de músculo de coelho (36.0 kDa), anidrase carbônica (29.0 kDa), tripsinogênio (24.0 kDa), inibidor de tripsina (20.1 kDa) e α -lactoalbumina de leite bovino (14.2 kDa).

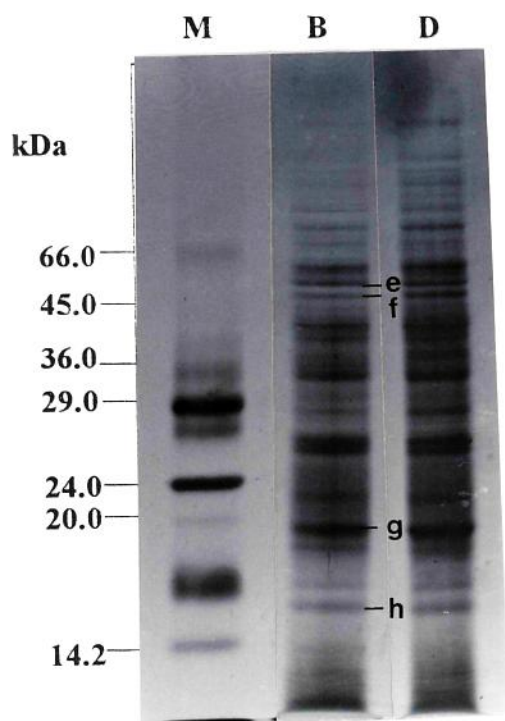


Figura 10 - Eletroforese de proteínas totais das linhagens de *S.aureus*: B e D. A canaleta M refere-se ao padrão de peso molecular contendo : albumina de plasma bovino (66.0 kDa), albumina de ovo (45.0 kDa), desidrogenase gliceraldeído-3 fosfato de músculo de coelho (36.0 kDa), anidrase carbônica (29.0 kDa), tripsinogênio (24.0 kDa), inibidor de tripsina (20.1 kDa) e α -lactoalbumina de leite bovino (14.2 kDa).

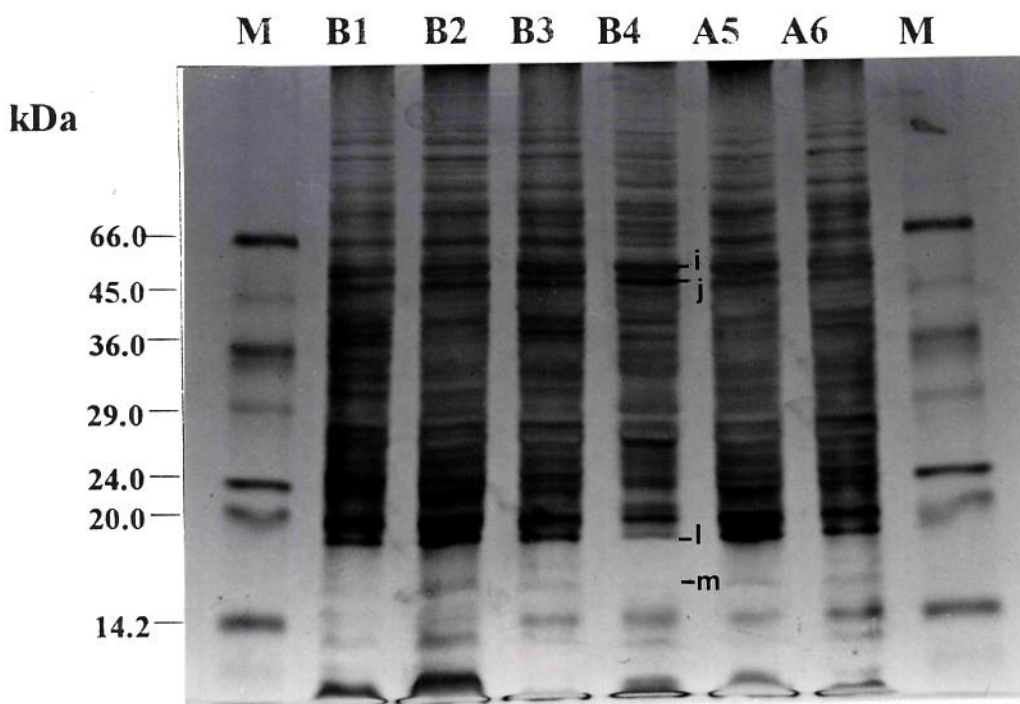


Figura 11 - Eletroforese de proteínas totais das linhagens de *S.aureus*: B1, B2, B3, B4, A5 e A6. A canaleta M refere-se ao padrão de peso molecular contendo : albumina de plasma bovino (66.0 kDa), albumina de ovo (45.0 kDa), desidrogenase gliceraldeído-3 fosfato de músculo de coelho (36.0 kDa), anidrase carbônica (29.0 kDa), tripsinogênio (24.0 kDa), inibidor de tripsina (20.1 kDa) e α -lactoalbumina de leite bovino (14.2 kDa).

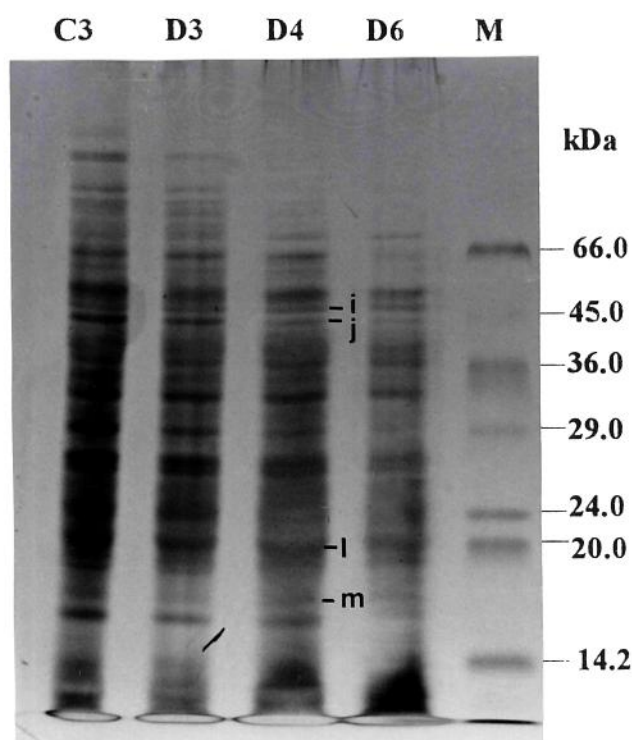


Figura 12 - Eletroforese de proteínas totais das linhagens de *S.aureus*: C3, D3, D4 e D6. A canaleta M refere-se ao padrão de peso molecular contendo: albumina de plasma bovino (66.0 kDa), albumina de ovo (45.0 kDa), desidrogenase gliceraldeído-3 fosfato de músculo de coelho (36.0 kDa), anidrase carbônica (29.0 kDa), tripsinogênio (24.0 kDa), inibidor de tripsina (20.1 kDa) e α -lactoalbumina de leite bovino (14.2 kDa).

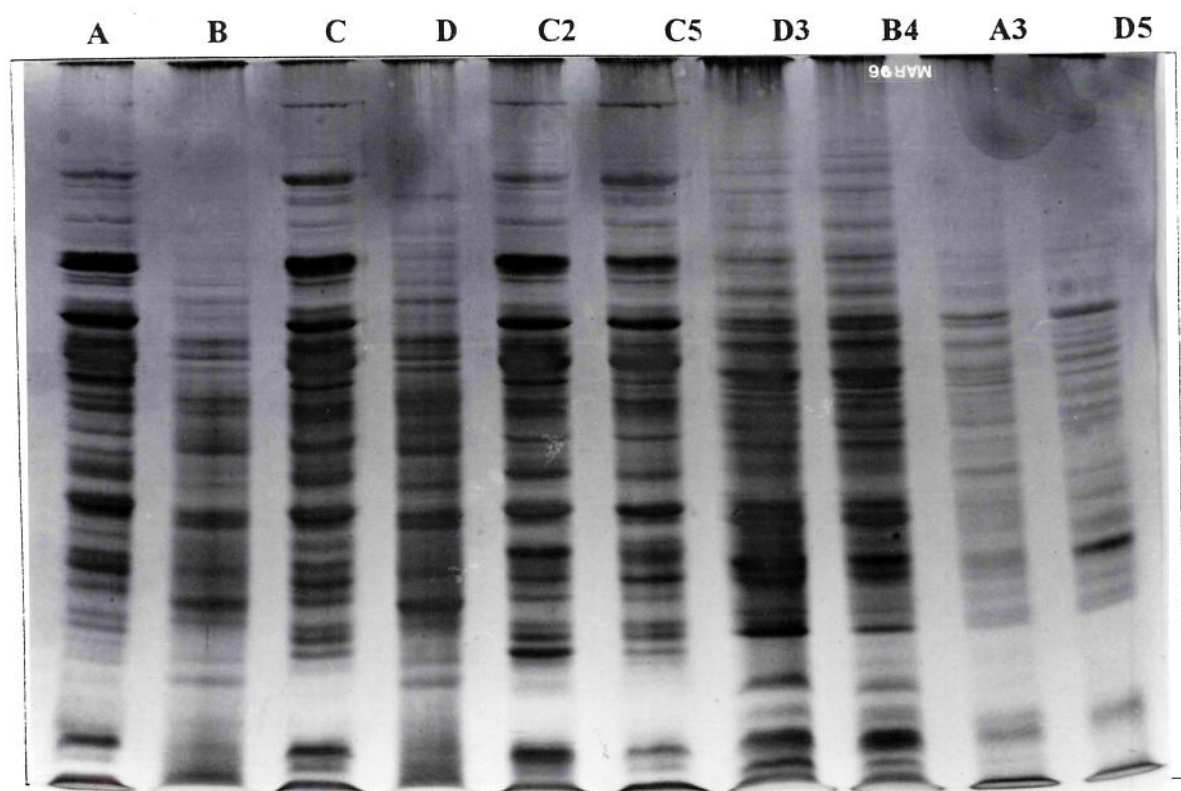


Figura 13 - Eletroforese de proteínas totais das linhagens de *S. aureus*: A, B, C, D, C2, C5, D3, B4, A3 e D5.

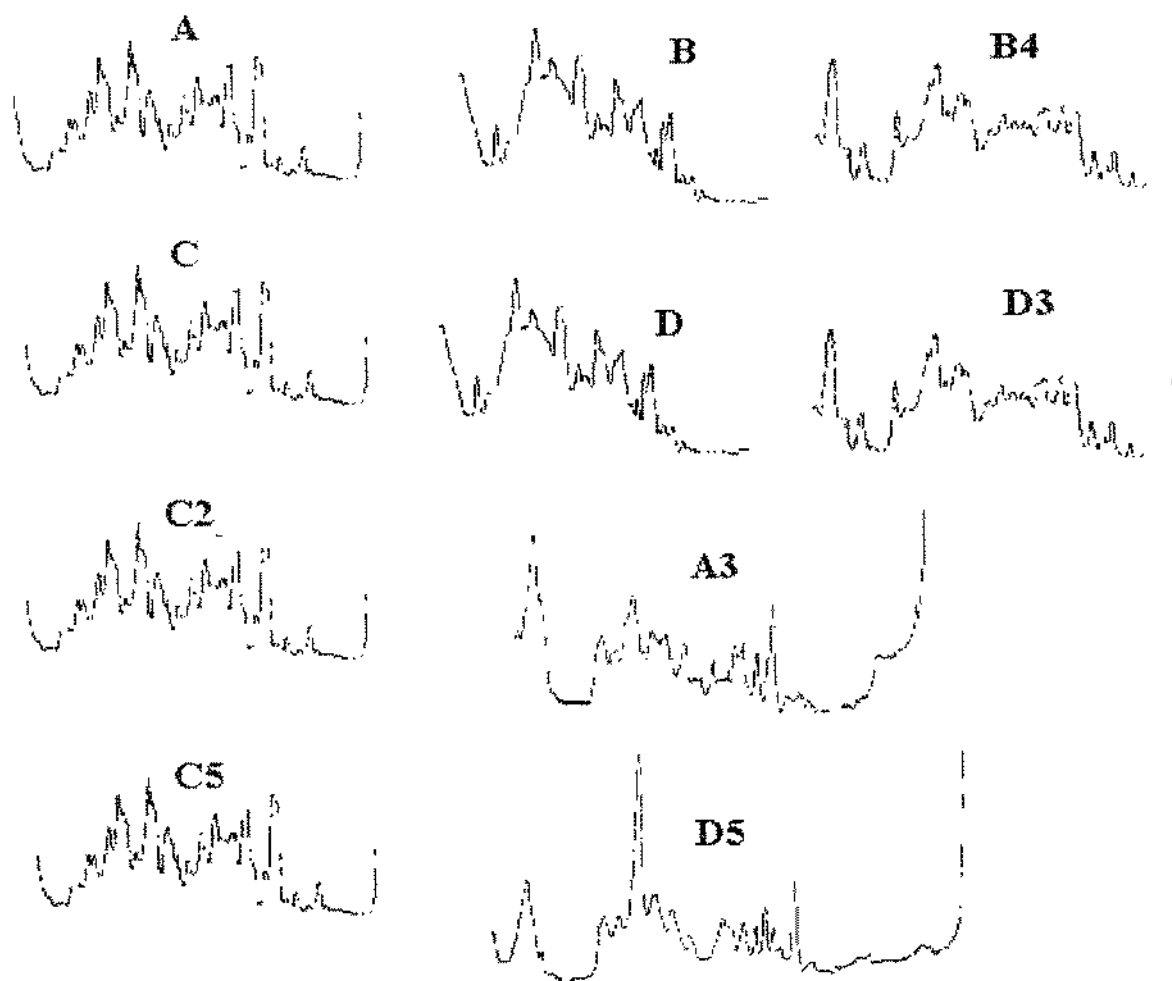


Figura 14 - Traços densitométricos das linhagens de *S.aureus*, obtidos a partir da eletroforese de proteínas totais apresentada na Figura13.

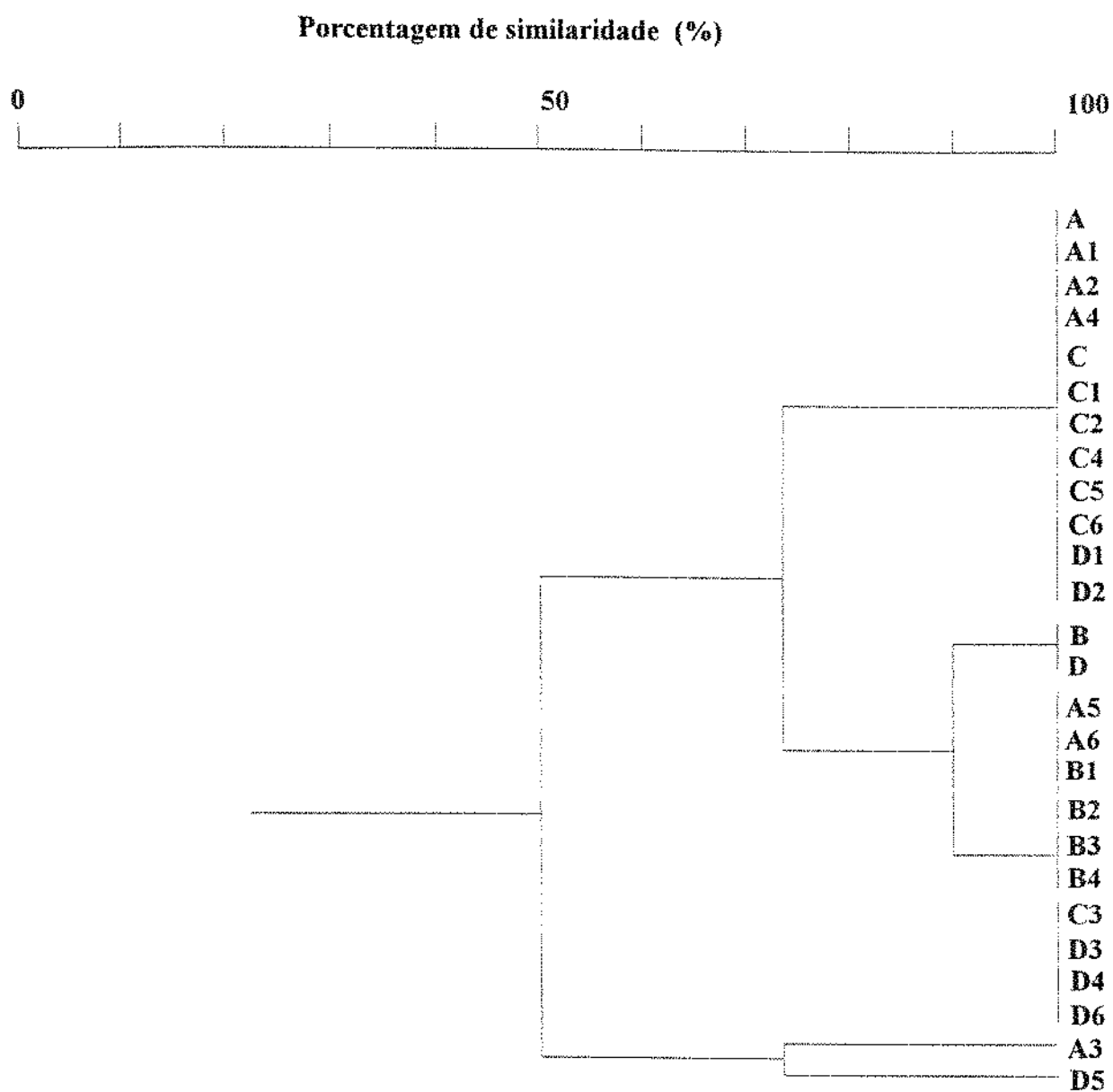


Figura 15 - Dendrograma indicando a porcentagem de similaridade das bandas eletroforéticas de proteínas totais (SDS-PAGE) entre linhagens de *S.aureus*, obtido pelo programa Gel Manager for Windows.

5. DISCUSSÃO

Foram analisadas 26 linhagens enterotoxigênicas de *Staphylococcus aureus*, das quais 22 eram linhagens selvagens isoladas de leite e presunto e as outras 4, consideradas de referência, foram as linhagens 772 (EEA), S6 (EEB), 1230 (EEC) e 1151 (EED) fornecidas pelo “Food Research Institute”-FRI da Universidade de Wisconsin, Madison, USA. Todas as linhagens foram denominadas de acordo com a enterotoxina por elas produzida. Sendo assim, as linhagens padrões foram denominadas A, B, C e D, e as linhagens selvagens, A1, A2, A3, A4, A5, A6, B1, B2, B3, B4, C1, C2, C3, C4, C5, C6, D1, D2, D3, D4, D5 e D6.

No presente trabalho, um dos objetivos propostos foi verificar a correlação entre a produção de toxina e outras características, que aqui foram observadas através das técnicas de RAPD e SDS-PAGE. Também pretendeu-se determinar a variabilidade entre as linhagens e a possibilidade de se verificar a organização dessa variabilidade em sub-grupos.

Nos experimentos de RAPD, pôde-se observar que nenhum isolado se mostrou idêntico a outro, o que revelou uma variabilidade muito grande entre as linhagens. Algumas poucas linhagens apresentaram perfil de fragmentos igual quando um determinado *primer* foi utilizado, entretanto, com a utilização de um novo *primer* as linhagens foram facilmente diferenciadas. Um exemplo disto são as linhagens C (canaleta 13) e C1 (canaleta 14) que apresentaram perfil semelhante com o *primer* OPQ1 (Figura 2), mas muito diferentes quando se utilizou OPQ6 (Figura 3). Os isolados A1 (canaleta 2) e A2 (canaleta 3) também representam outro exemplo, ao apresentarem perfil de fragmentos muito semelhante em OPQ1 (Figura 2), OPQ6 (Figura 3) e OPQ12 (Figura 4), mas diferenciados quando em OPR1 (Figura 5), onde o isolado A2 revelou apenas uma banda e A1 não sofreu amplificação.

A análise do dendrograma dos produtos de RAPD (Figura 7) possibilitou, a um nível de 30% de similaridade, a formação de 2 sub-grupos envolvendo 16 isolados no primeiro e 8 no segundo. A similaridade entre esses grupos foi constatada a um nível de aproximadamente 20%. As 3 linhagens restantes (A6, D e D3) não foram alocadas nesses sub-grupos e nem

tampouco foram agrupadas em um único grupo, por não apresentarem semelhanças entre os perfis de fragmentos obtidos.

Um fato a ser mencionado seria o de não ter ocorrido o agrupamento apenas de linhagens produtoras do mesmo tipo de enterotoxina, mas também de enterotoxinas diferentes, o que permite afirmar não haver correlação entre os perfis obtidos e a produção de toxinas.

A grande variabilidade constatada pode estar relacionada com o isolamento das linhagens. Sabe-se que nem todas as linhagens foram provenientes de leite cru, mas também de presunto. Além disso, o leite não foi oriundo de um único laticínio, mas de vários do estado de São Paulo, o mesmo ocorrendo com o presunto que foi adquirido de diferentes padarias da cidade de Campinas (SP).

MATTHEWS *et al.* (1994), ao contrário do que obtido aqui, reportaram com sucesso o agrupamento de linhagens de *S.aureus*, causadores de mastite bovina, provenientes de mesma localização geográfica, utilizando a metodologia de *fingerprinting* com PCR.

Quanto às linhagens coagulase negativa (CN), contrariamente a MATTHEWS e OLIVER (1994) que diferenciaram espécies de *Staphylococcus*, incluindo linhagens CN, através da reação em cadeia por polimerase (PCR), os resultados obtidos por RAPD deste trabalho não permitiram o agrupamento das linhagens CN num único sub-grupo.

Outro ponto importante a ser ressaltado seria o uso desta técnica para a produção de padrões únicos ou *fingerprints*, que poderiam ser úteis na investigação de surtos de intoxicação alimentar provocados por *S.aureus*.

WELSH e MC CLELLAND (1990) mostraram que linhagens de 5 espécies diferentes de *Staphylococcus* poderiam ser diferenciadas através da comparação de seus *fingerprints* gerados por RAPD através da reação em cadeia por polimerase (PCR), utilizando 16 *primers* de sequência arbitrária.

Para os experimentos de SDS-PAGE, os perfis eletroforéticos produzidos pelas linhagens foram comparados visualmente (STEPHENSON

et al., 1986), onde bandas características foram usadas na diferenciação e agrupamento das linhagens.

Não houve separação de certas bandas de proteínas, resultando em um empacotamento que pode ter influenciado na análise dos perfis eletroforéticos das linhagens. Como esta técnica baseia-se na comparação de perfis eletroforéticos foi imprescindível a padronização do meio de cultura e das condições de cultivo das linhagens, como por exemplo, temperatura e tempo. As proteínas padrões de peso molecular conhecido foram aplicadas em cada gel para posterior ajuste das diferenças de corrida da eletroforese entre os géis caso fosse necessário.

A análise dos géis de eletroforese de proteínas totais possibilitou a constatação de uma série de linhagens com 100% de similaridade, dentro dos critérios de visualização utilizados. Um exemplo disto foi o agrupamento das linhagens A, A1, A2, A4, C, C1, C2, C4, C5, C6, D1 e D2, consideradas idênticas por apresentarem perfis eletroforéticos similares, com as bandas características **a**, **b**, **c** e **d** (Figuras 8 e 9) ausentes nas outras linhagens. É preciso ressaltar que apesar dessas linhagens terem sido consideradas idênticas, podem ser detectadas algumas bandas diferenciais numa análise mais detalhada.

Um fato interessante observado foi o aparecimento de bandas de proteínas na região de 24 a 29 kDa em todas as linhagens estudadas, permitindo supor que estas bandas correspondam às enterotoxinas produzidas, que por sua vez possuem peso molecular nesta faixa (TRANTER, 1990).

A partir do dendrograma de similaridade obtido, foi possível constatar a formação de 2 sub-grupos. O primeiro envolveu 12 linhagens consideradas idênticas e o segundo também foi composto por 12 linhagens, das quais 10 foram consideradas idênticas. Esses dois sub-grupos formados mostraram-se similares entre si a um nível de aproximadamente 80%. As linhagens A3 e D5 não foram alocadas em nenhum dos sub-grupos por não apresentarem perfil eletroforético semelhante ao dessas linhagens, mas se mostraram similares entre si a um nível de 70%.

Confirmando os resultados obtidos por RAPD, o dendrograma de SDS-PAGE também não revelou correlação com a produção de toxinas, agrupando linhagens produtoras de diferentes enterotoxinas num mesmo sub-grupo.

Quanto às linhagens coagulase negativa (CN), como em RAPD, não foram agrupadas em um único grupo, possibilitando afirmar que esta técnica, SDS-PAGE, não permite a diferenciação entre linhagens CN das coagulase positiva.

A partir dos traços densitométricos das linhagens foi possível confirmar a similaridade, os agrupamentos e a diferenciação entre elas. Com sucesso também, COSTAS *et al.* (1989) agruparam 50 linhagens de *S.aureus* resistentes à meticilina (MRSA) a partir da análise por densitometria e elaboraram dendrograma correspondente.

De posse dos dendogramas obtidos por RAPD e SDS-PAGE, ao comparar-se o 1^o sub-grupo de RAPD com o 1^o sub-grupo de SDS-PAGE verificou-se entre eles uma concordância de 56%, isto é, 9 linhagens (A, A1, A2, A4, C, C1, C4, C5 e C6) de um total de 16, estavam presentes nos dois 1^{os} sub-grupos das diferentes técnicas. Já a comparação entre o 2^o sub-grupo formado por RAPD com o 2^o sub-grupo formado por SDS-PAGE, a concordância constatada foi de 43%, ou seja, apenas 3 linhagens (B2, C3 e D4) de um total de 7 foram comuns aos 2 sub-grupos formados. Quanto às linhagens que não foram alocadas em sub-grupos no dendrograma de RAPD (A6, D e D3), o mesmo não foi observado na análise por PAGE, onde tais linhagens se mostraram semelhantes ao ponto de permitir seu agrupamento às demais do 2^o sub-grupo. Por sua vez, as linhagens não alocadas em PAGE (A3 e D5), foram agrupadas em RAPD (A3 no 1^o sub-grupo e D5 no 2^o sub-grupo).

Um fato interessante que deve ser mencionado consiste na divergência dos resultados quanto a não confirmação por RAPD, das linhagens consideradas idênticas por SDS-PAGE. Um exemplo disto reside nas linhagens B4 e D3, consideradas idênticas por eletroforese de proteínas, mas apenas 10% similares quando submetidas à análise por RAPD.

Concluindo, as duas técnicas (RAPD e SDS-PAGE) utilizadas no presente trabalho forneceram características fenotípicas e por sua vez não

revelaram o grau de homologia existente entre as linhagens. Uma divisão em sub-grupos seria possível utilizando-se um número maior de características. É o caso das espécies de *Lactobacillus* que são identificadas através da utilização de uma série de métodos, como por exemplo, a amplificação do DNA por PCR, seguida de hibridização com sondas conhecidas, métodos convencionais (catalase, fermentação de açúcares), métodos quimiotaxonômicos (PAGE), e homologia de DNA (LOGAN, 1994).

6. CONCLUSÕES

Baseado nos resultados obtidos neste estudo, e de acordo com os comentários feitos nas secções anteriores, pode-se concluir que :

- (1) Foi constatada uma variabilidade muito grande entre as linhagens de *Staphylococcus aureus* com a utilização da técnica de RAPD, onde o dendrograma construído revelou a formação de 2 sub-grupos a um nível de 30% de similaridade.
- (2) Através dos perfis eletroforéticos de proteínas totais, obtidos por SDS-PAGE, verificou-se a formação de 2 sub-grupos a um nível de similaridade na faixa de 90% entre as linhagens estudadas.
- (3) As linhagens de *Staphylococcus aureus* revelaram alta variabilidade entre si através dos perfis eletroforéticos de DNA, enquanto que os perfis eletroforéticos de proteínas indicaram uma alta quantidade de linhagens idênticas. Isto mostra a não concordância entre os resultados obtidos pelas duas técnicas aqui empregadas.
- (4) Não foi evidenciada correlação entre as características observadas com as duas técnicas e a capacidade de produção de enterotoxinas.
- (5) Quanto às linhagens coagulase negativa (CN) utilizadas neste trabalho, o perfil eletroforético de proteínas totais demonstrou que A1 e A4 apresentaram similaridades, assim como A6, B1, B2, B3 e B4. Entretanto, A3 e D4 apresentaram-se diferentes das demais. Em vista disto, a eletroforese de proteínas totais não pode ser utilizada como método definitivo para a identificação dessas linhagens. O mesmo vindo a acontecer com a metodologia de RAPD que não revelou grande porcentagem de similaridade entre as linhagens, com a utilização desses *primers*.

- (6) Quanto às linhagens provenientes de presunto, todas foram consideradas idênticas quando submetidas à SDS-PAGE, com exceção da linhagem C2 que apresentou 75% de similaridade com as demais. Isto confirma a proximidade destas linhagens com as demais. Já quando analisadas por RAPD, essas linhagens apresentaram-se similares ao nível de 50%.
- (7) Neste trabalho, a metodologia de RAPD não conseguiu relacionar as linhagens de acordo com as enterotoxinas produzidas, o que não quer dizer que esta relação seja inexistente. Talvez empregando-se outros *primers* isto venha a se tornar possível, visto que a região amplificada no genoma foi muito pequena e não significativa para este fim.
- (8) Outras metodologias podem ser sugeridas com o intuito de se verificar a existência da correlação entre as linhagens enterotoxigênicas de *Staphylococcus aureus* e a capacidade de produção das enterotoxinas, como por exemplo, a hibridização de DNA com sondas contendo genes para a produção de toxinas e a ribotipagem.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTBOUM, Z. ; HERTMAN, I. & DAVID, S.. Penicillinase plasmid-linked genetic determinants for enterotoxins B and C₁ production in *Staphylococcus aureus*. **Infect. Immun.**, **47** : 514-521, 1985.
- ARBUTHNOTT, J. P.; COLEMAN, D. C. & AZAVEBO, D. P. Staphylococcal human disease. In : Jones, D. P.; Board, K. G. & Sussuman, M. **Staphylococci**. Oxford, Blackwell, 101-107, 1990.
- BAER, F. E.; GRAY, R. J. H. & ORTH, D. S. Methods for the isolation and enumeration of *Staphylococcus aureus*. In: Speck, M. L., ed. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. New York, Academic Press, 374-384, 1981.
- BAIRD-PARKER, A.C. The *staphylococci* : an introduction. **J. Appl. Bacteriol. Symposium supplement**, 15-85, 1990.
- BAUMGARTNER, A.; NICOLET, J. & EGGIMANN, M. Plasmid profiles of *Staphylococcus aureus* causing bovine mastitis. **J. Appl. Bacteriol.**, **56** : 159-163, 1984.
- BAYLES, K. W. & IANDOLO, J. J. Genetic and molecular analyses of the gene encoding staphylococcal enterotoxin D. **J. Bacteriol.**, **171**(9) : 4799-4806, 1989.
- BENNETT, R. W. Microbiological methods. **J. AOAC**, **54** ; 1037-1038, 1971.

BENNETT, R. W. ; YETERION, M. & SMITH, W. *Staphylococcus aureus* identification characteristics and enterotoxigenicity. **J. Food Science**, **51** : 1337-1339, 1986.

BERGDOLL, M.S. Enterotoxins. In: Montie, T. ; Kadis, S. & Ajl, S. **Microbial Toxins**, New York, Academic Press, v.3, p. 265-276, 1970.

BERGDOLL, M. S. The enterotoxins. In: **The Staphylococci**, ed. J. O. Cohen, New York, p.187-248, 1972.

BERGDOLL, M. S. Staphylococcal Intoxications. In : Rieman, H. and Bryan, F. L., **Food Borne Infections and Intoxications**. Academic Press, New York, p.443 - 494, 1979.

BERGDOLL, M.S. Enterotoxins. In: **Staphylococci and staphylococcal infections** (Eds Easmon, C.S.F. and Adlam, C.) p.559-598, New York Academic Press, 1983.

BERGDOLL, M.S. *Staphylococcus aureus*. In: Doyle, M.P. (ed). **Foodborne bacterial pathogens**. INC, New York, p.463-523, 1989.

BERGDOLL, M.S. Staphylococcal food poisoning. In: Cliver, D.O. (ed). **Foodborne diseases**. San Diego, CA, Academic Press, cap.5, p.86-106, 1990.

BERGDOLL, M.S.; CRASS, B.A.; REISER, R.F. et al. A new staphylococcal enterotoxin F, associate with toxic-shock syndrome *Staphylococcus aureus* isolated. **The Lancet**, **1**: 1017-1021, 1981.

- BERGDOLL, M. S. & ROBBINS, R. N. Characterizations of types staphylococcal enterotoxins. **J. Milk Food Technol.**, **36**(12): 610-612, 1973.
- BETLEY, M. J. & BERGDOLL, M. S. Staphylococcal enterotoxin type C genes not associated with extrachromosomal DNA. **Abstr. Annu. Meet. Am. Soc. Microbiol.**, p.49, 1981.
- BETLEY, 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.**, **55** : 1-35, 1992.
- BETLEY, M. J. & HARRIS, T. O. Staphylococcal enterotoxins : genetic characterization and relationship between structure and emetic activity. **Food Microbiology**, **11** : 109-121, 1994.
- BETLEY, M. J. ; LOFDAHL, S. ; KREISWIRTH, B. N. ; BERGDOLL, M. S. & NOVICK, R. P. Staphylococcal enterotoxin A is associated with a variable genetic element. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **81** : 5179-5183, 1984.
- BETLEY, M. J. & MEKALANOS, J. J. Staphylococcal enterotoxin A is encoded by phage. **Science**, **229** : 185-187, 1985.
- BETLEY, M. J. & MEKALANOS, J. J. Nucleotide sequence of the type A staphylococcal enterotoxin gene. **J. Bacteriol.**, **170** (1): 34-41, 1988.
- BETLEY, M. J. ; MILLER, V. L. & MEKALANOS, J. J. Genetics of bacterial enterotoxins. **Annu. Rev. Microbiol.**, **40** : 577-605, 1986.

- BLUM, H. ; BEIER, H. & GROSS, H. J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrilamide gels. **Electrophoresis**, **8** : 93-99, 1987.
- BONACH, G. A. & SCHLIEVERT, P. M. Expression of staphylococcal enterotoxin C1 in *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, **55** : 428-432, 1987.
- BONACH, G. A. & SCHLIEVERT, P. M. Nucleotide sequence of the staphylococcal enterotoxin C1 gene and relatedness to other pyrogenic toxins. **Mol. Gen. Genet.**, **209** : 15-20, 1987.
- BROCK, T. D. & MADIGAN, M. T. **Biology of Microorganisms**. 6 ed. Prentice Hall, Inc., New Jersey, 1991.
- BROUSSEAU, R. ; SAINT-ONGE, A. ; PRÉFONTAINE, G. ; MASSON, L. & CABANA, J. Arbitrary primer polymerase chain reaction, a powerful method to identify *Bacillus thuringiensis* serovars and strains. **Appl. Environ. Microbiol.**, **59** : 114-119, 1993.
- CAETANO-ANNOLLÉS, G. ; BASSAM, B. J. & GRESSHOFF, P. M. DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. **Bio/ Technol.**, **9** : 553-557, 1991.
- CANCILLA, M. R. ; POWELL, I. B. ; HILLIER, A. J. & DAVIDSON, B. E. Rapid genomic fingerprinting of *Lactococcus lactis* strains by arbitrary primed polymerase chain reaction with ³²P and fluorescent labels. **Appl. Environ. Microbiol.**, **58** : 1772-1775, 1992.
- CASMAN, E. P. Staphylococcal enterotoxin. **Ann. NY Acad. Sci.**, **128** : 124-131, 1965.

- COSTAS, M. ; COOKSON, B. ; TALSANIA, H. & OWEN, R. Numerical analysis of electrophoretic protein patterns of methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*. **J. Clin. Bacteriol.**, **27** (11): 2574-2581, 1989.
- COUCH, J. L. ; SALTIS, M.T. & BETLEY, M. J. Cloning and nucleotide sequence of the type E staphylococcal enterotoxin gene. **J. Bacteriol.**, **170** : 2954-2960, 1988.
- COUTINHO, H. L. C. ; HANDLEY, B. A. ; KAY, H. E. ; STEVENSON, L. & BERINGER, J. E. The effect of colony age on PCR fingerprinting. **Lett. Appl. Microbiol.**, **17** : 282-284, 1993.
- CRASS, B. A. & BERGDOLL, M. S. Involvement of coagulase-negative *staphylococci* in toxic shock syndrome. **J. Clin. Microbiol.**, **23** : 43-45, 1986.
- DANIELSSON, M. L. & HELLBERG, B. The biochemical activity of enterotoxin and non-enterotoxin producing *staphylococci*. **Acta Vet. Scand.**, **18** : 266-273, 1977.
- DANIELSSON, M. L. & HELLBERG, B. Prevalence of enterotoxigenic *staphylococci* in nose, throat and skin lesions in meat workers. **Acta Vet. Scand.**, **25** : 242-249, 1984.
- DAVIDSON, I. A collaborative investigation of phages for typing bovine *staphylococci*. **Bull. World Health Org.**, **46** : 81-98, 1972.
- DAY, M. The biology of plasmids. **Sci. Prog., Ox.**, **71** : 203-220, 1987.

- DYER, D. W. & IANDOLO, J. J. Plasmid-chromosomal transition in genes important in staphylococcal enterotoxin B expression. **Infect. Immun.**, **33** : 450-458, 1981.
- EISENSTEIN, B. I. The polymerase chain reaction. **N. Engl. J. Med.**, **322** : 178-183, 1990.
- EISENSTEIN, B. I. New molecular techniques for microbial epidemiology and the diagnosis of infectious diseases. **J. Infect. Dis.**, **161** : 595-602, 1990.
- EVANS, J. B. ; BEUTTNER, L. G. & NIVEN Jr., C. F. Evaluation of coagulase test in the study of *staphylococci* associated with food poisoning. **J. Bacteriol.**, **6** : 481-484, 1950.
- FACH, P. ; HAUSER, D. ; GUILLOU, J. P. & POPOFF, M. R. Polymerase chain reaction for the rapid identification of *Clostridium botulinum* type A strains and detection in food samples. **J. Appl. Bacteriol.**, v.75, p.234-239, 1993.
- FAST, D. ; SCHLIEVERT, P. M. & NELSON, R. D. Toxic shock syndrome-associated staphylococcal and streptococcal pyrogenic exotoxins are potent inducers of tumor necrosis factor production. **Infect. Immun.**, **57** : 291-294, 1989.
- FRENEY, J. ; BRUN, Y. ; BES, M. ; MEUGNIER, H. ; GRINIONT, F. ; GRIMONT, P. A. D. ; NERVI, C. & FLEURETT, J. *Staphylococcus lugdunensis* sp. nov. and *Staphylococcus schleiferi* sp. nov. Two species from human clinical specimes. **Internat. Journal Systematic Bacteriol.**, **38** : 168-172, 1988.

- FUKUDA, S. ; TOKUNA, H. ; OGAWA, H. ; SASAKI, M. ; KISHIMOTO, T. ; KAWANO, J. ; SHIMIZU, A. & KIMURA, S. Enterotoxigenicity of *Staphylococcus intermedius* strains isolated from dogs. **Zbl. Bakteriол. Hyg.**, **258** : 360-367, 1984.
- GENIGEORGIS, C. A. Present state of knowledge on staphylococcal intoxication. **Int. J. Food Microbiol.**, **9** : 327- 360, 1989.
- GILMOUR, A. & HARVEY, J. *Staphylococci* in milk and milk products. **J. Appl. Bacteriol. - symposium supplement**, 147 S - 166 S, 1990.
- GIOVANNONI, S. The polymerase chain reaction. In: **Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics**. (E. Stackebrandt and M. Goodfellow ; des.) John Wiley & Sons Ltd. p.177-203, 1991.
- GOMEZ-LUCÍA, E.; GOYACHE, J.; ORDEN, J.A. Production of enterotoxin A by supposedly nonenterotoxigenic *Staphylococcus aureus* strains. **Appl. Environ. Microbiol.**, **55** (6) : 1447-1451, 1989.
- GRIMONT, F. & GRIMONT, P. A. D. DNA Fingerprinting. In: **Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics**. (E. Stackebrandt and M. Goodfellow ; des.) John Wiley & Sons Ltd. p.249-279, 1991.
- HARRIS, T. O. ; GROSSMAN, D. ; KAPPLER, J. W. ; MARRACK, P. ; RICH, R. R. & BETLEY, M. J. Lack of complete correlation between emetic and T-cell-stimulatory activities of staphylococcal enterotoxins. **Infect. Immun.**, **61**(8) : 3175-3183, 1993.
- HOOVER, D. G. ; TATINI, S. R. & MALTAIS, J. B. Characterization of *Staphylococci*. **Appl. Environ. Microbiol.**, **46** : 649-660, 1983.

- IANDOLO, J.J. Genetic analysis of extracellular toxins of *Staphylococcus aureus*. **Annu. Rev. Microbiol.**, **43** : 375-402, 1989.
- JACKMAN, P. J. H. Bacterial identification based on electrophoretic whole-cell protein patterns, 115-129. In : M. Goodfellow and D. E. Minnikin (ed.), **Chemical Methods in Bacterial Systematics**. SAB technical series n.20. Academic Press, Inc., London, 1985.
- JARVIS, A. W. & LAWRENCE, R. C. Production of extracellular enzymes and enterotoxin A, B and C by *Staphylococcus aureus*. **Infect. Immun.**, **4** : 110-115, 1971.
- JOHNS Jr., M. B. & KHAN, S. A. Staphylococcal enterotoxin B is associated with a discrete genetic element. **J. Bacteriol.**, **170** : 4033-4039, 1988.
- JORDENS, J. Z. & HALL, L. M. C. Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates by restriction endonuclease digestion of chromosomal DNA. **J. Med. Microbiol.**, **27**: 117-123, 1988.
- KAJI, D. A. **Taxonomia molecular de *Bacillus* entomopatogênicos**. Campinas, 1993, 99 p. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos, área de Microbiologia) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- KERSTERS, K. & DE LEY, J. Identification and grouping of bacteria by numerical analysis of their electrophoretic protein patterns. **J. General Microbiol.**, **87** : 333-342, 1975.
- KRIKLER, S. J. ; PENNINGTON, T. H. & PETRIE, D. Typing of strains of *Staphylococcus aureus* by Western blot analysis of culture supernatants. **J. Med. Microbiol.**, **21**: 169-171, 1986.

- KÜES, U. & STAHL, U. Replication of plasmids in Gram-negative bacteria. **Microbiol. Rev.**, **53** : 491-516, 1989.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. **Nature**, **227**: 676-685, 1970.
- LAWRENCE, L. M. ; HARVEY, J. & GILMOUR, A. Development of a random amplification of polymorphic DNA typing method for *Listeria monocytogenes*. **Appl. Environ. Microbiol.**, **59**(9): 3117-3119, 1993.
- LEE, W, & BURNIE, J. P. Fingerprinting methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by immunoblot technique. **J. Med. Microbiol.**, **25** : 261-268, 1988.
- LOGAN, N. A. **Bacterial Systematics**, ed. Blackwell Scientific Publications, London, 1994.
- LOTTER, L. P. & GENIGEORGIS, C. Desoxyribonucleic acid base composition and biochemical properties of certain coagulase-negative enterotoxigenic cocci. **Appl. Microbiol.**, **39** : 152-158, 1975.
- MALLONNE, D. H. ; GLATZ, B. A. & PATTEE, P. A. Chromosomal mapping of a gene affecting enterotoxin A production in *Staphylococcus aureus*. **Appl. Environ. Microbiol.**, **43** : 397-402, 1982.
- MARRACK, P. & KAPPLER, J. The staphylococcal enterotoxins and their relatives. **Science**, **248** : 705-711, 1990.

- MATTHEWS, K. R. ; JAYARAO, B. M. & OLIVER, S. P. Plasmid pattern analysis of *Staphylococcus* species isolated from bovine mammary secretions. **J. Dairy Science**, **75** : 3318-3323, 1992.
- MATTHEWS, K. R. ; JAYARAO, B. M. & OLIVER, S. P. Restriction endonuclease fingerprinting of genomic DNA of *Staphylococcus* species of bovine origin. **Epidemiol. Infect.**, **109** : 59-68, 1992.
- MATTHEWS, K. R. ; KUMAR, S. J. ; O'CONNER, S. A. O. ; HARMON, R. J. ; PANKEY, J. W. ; FOX, L. K. & OLIVER, S. P. Genomic fingerprinting of *Staphylococcus aureus* of bovine origin by polymerase chain reaction-based DNA fingerprinting. **Epidemiol. Infect.**, **112** : 177-186, 1994.
- MATTHEWS, K. R. & OLIVER, S. P. Differentiation of *Staphylococcus* species by polymerase chain reaction-based DNA fingerprinting. **J. Food Protection**, **57** (6): 486-489, 1994.
- MAZURIER, S. ; AUDURIER, A. ; MARQUET - VAN DER MEER, N. ; NOTERMANS, S. & WERNARS, K. A comparative study of randomly amplified polymorphic DNA analysis and conventional phage typing for epidemiological studies of *Listeria monocytogenes* isolates. **Res. Microbiol.**, **143** : 507-512, 1992.
- MAZURIER, S. ; VAN DE GIESSEN, A. ; HEUVELMAN, K. & WERNARS, K. RAPD analysis of *Campylobacter* isolates : DNA fingerprinting without the need to purify DNA. **Lett. Appl. Microbiol.**, **14** : 260-262, 1992.
- MAZURIER, S. & WERNARS, K. Typing of *Listeria* strains by random amplification of polymorphic DNA. **Res. Microbiol.**, **143** : 499-505, 1992.

- MINOR, I. E. & MARTH, E. H. Staphylococcal food poisoning. A review. Characteristics and isolation of *staphylococci* properties of enterotoxins and epidemiology of staphylococcal intoxications. **The Ind. J. Nutr. Dietet.**, 9 : 161-186, 1972.
- MUNSON, S. H. & BETLEY, M. J. Partial characterization of a new staphylococcal enterotoxin gene. In : **Abstracts of the 91st general Meeting of the American Society for Microbiology**, B-36 : 31, American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1991.
- MURAKAMI, K. ; MINAMIDE, W. ; WADA, K. ; NAKAMURA, E. ; TERAOKA, H. & WATANABE, S. Identification of methicillin-resistant strains of *Staphylococci* by polymerase chain reaction. **J. Clin. Microbiol.**, 29(10) : 2240-2244, 1991.
- MYERS, L. E. ; SILVA, S. V. P. S. ; PROCUNIER, J. D. & LITTLE, P. B. Genomic fingerprinting of '*Haemophilus somnus*' isolates by using a random-amplified polymorphic DNA assay. **J. Clin. Bacteriol.**, 31: 512-517, 1993.
- NANU, E. & NARAYAN, K. G. Enterotoxin production by *staphylococci* isolated from pork kalab, salami and other sources by Elisa. **J. Food Sci. Technol.**, 29 (4) : 383-384, 1992.
- NIEDERHAUSER, C. ; CANDRIAN, U. ; HÖFELEIN, C. ; JERMINI, M. ; BÜHLER, H. -P. & LÜTHY, J. Use of polymerase chain reaction for detection of *Listeria monocytogenes* in foods. **Appl. Environ. Microbiol.**, 58 (5) : 1564-1568, 1992.

NOTERMANS, S. ; HEUVELMAN, K. L. & WERNARS, K. Synthetic enterotoxin B DNA probes for detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus*. **Appl. Environ. Microbiol.**, **54** (2): 531-533, 1988

OLIVEIRA, A. M. **Estafilococos enterotoxigênicos : Pesquisa de cepas produtoras e baixo produtoras de enterotoxinas isoladas de leite cru de bovino**. Campinas, 1995, 90p. Tese (Mestre em Ciência de Alimentos)- Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas.

OEDING, P. Serological typing of *staphylococci*. **Acta Pathol. Microbiol. Scand.**, **93** : 356-363, 1957.

PARK, C. E. ; MELO, A. S. ; LANDGRAF, M. ; HUANG, J. C. ; STANKIEWICZ, Z. & RAYMAN, M. K. A survey of microorganisms for thermonuclease production. **Can. J. Microbiol.**, **26** : 532-535, 1980.

PATTEE, P. A. & GLATZ, B. A. Identification of a chromosomal determinant of enterotoxin A production in *Staphylococcus aureus*. **Appl. Environ. Microbiol.**, **39** : 186-193, 1980.

PEREIRA, J. L. & SALZBERG, S. P. C. Regulation of staphylococcal enterotoxins A and B produced by strain S6. **J. Food Protection**, **45** : 1306-1309, 1982.

PFALLER, M. A. Typing methods for epidemiologic investigations. In: Balows, A. ; Hausler, W. ; Herrmann, K. ; Isenberg, H. & Shadomy, H. (ed.), **Manual of clinical microbiology**, 5th ed. American Society for Microbiology, Washington, DC, p.171-182, 1991.

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

PRIEST, F. & AUSTIN, B. **Modern Bacterial Taxonomy** (2nd edition). Chapman & Hall, London, 1993.

PRIEST, F. G. ; KAJI, D. A. ; ROSATO, Y. B & CANHOS, V. P. Characterization of *Bacillus thuringiensis* and related bacteria by ribosomal RNA gene restriction fragment length polymorphisms. **Microbiol.**, **140** :1015-1022, 1994.

RANELLI, D. M. ; JONES, C. L. ; JOHNS, M. B. ; MUSSEY, G.J. & KHAN, S.A. Molecular cloning of staphylococcal enterotoxin B gene in *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **82** : 5850-5854, 1985.

RASMUSSEN, H. N. ; OLSEN, J. E. & RASMUSSEN, O. F. RAPD analysis of *Yersinia enterocolitica*. **Lett. Appl. Microbiol.**, **19** : 359-362, 1994.

ROBBINS, R.; GOULD, S. & BERGDOLL, M. S. Detecting the enterotoxigenicity of *Staphylococcus aureus* strains. **Appl. Microbiol.**, **28** : 946-950, 1974.

SAIKI, R. K. ; GELFAND, D.H. ; STOFFEL, S. ; SCHARF, S. J. ; HIGUCHI, R. ; HORY, G. T. ; MULLIS, K. B. & ERLICH, H. Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, **239** : 487-491, 1988.

SAMBROOK, J. ; FRITISCH, E. F. & MANIATIS, T. **Molecular Cloning. A Laboratory Manual**. 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA, 1989.

SAULNIER, P. ; BOURNIEX, C. ; PRÉVOST, G. & ANDREMONT, A. Random amplified polymorphic DNA assay is less discriminant than pulsed-field gel electrophoresis for typing strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **J. Clin. Microbiol.**, **31** (4) : 982-985, 1993.

SCHLEIFER, K. H. *Micrococcaceae*. In : Sneath, P. H. A. ; Mair, N. S.; Sharpe, M. E. & Holt, J. G. (eds) **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, v.2, Williams and Wilkins, Baltimore, M. D., p.1003-1035, 1986.

SHAFFER, W. M. & IANDOLO, J. J. Staphylococcal enterotoxin A : A chromosomal gene product. **Appl. Environ. Microbiol.**, **36** : 389-391, 1978.

SHAFFER, W. M. & IANDOLO, J. J. Chromosomal locus for the enterotoxin B gene in *Staphylococcus aureus*. **Infect. Immun.**, **20** : 273-278, 1978.

SHINGAKI, M. H. ; IGARASHI, H.; FUJIKAWA, H. et al. Study on reversed passive latex agglutination for detection of staphylococcal enterotoxins A-C. **Annual Report Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health**, **32** : 128-131, 1981.

SOLTIS, M. T.; MEKALANOS, J. J. & BETLEY, M. J. Identification of a phage containing a staphylococcal variant enterotoxin gene (*sez A+*). **Infect. Immun.**, **58** : 1614-1619, 1990.

- SPERBER, W. H. The identification of *Staphylococci* in clinical and food microbiology laboratories. **CRC Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.**, 7: 121-184, 1976.
- STEPHAN, R. ; SCHRAFT, H. & UNTERMANN, F. Characterization of *Bacillus licheniformis* with the RAPD technique (randomly amplified polymorphic DNA). **Lett. Appl. Microbiol.**, 18 : 260-263, 1994.
- SU, Y. -C. & WONG, A. C. L. Identification and purification of a new staphylococcal enterotoxin H. **Appl. Environ. Microbiol.**, 61 (4) : 1438-1443, 1995.
- SU, Y. -C. & WONG, A. C. L. Optimal condition for the production of unidentified staphylococcal enterotoxins. **J. Food Prot.**, 56 : 313-316, 1993.
- SUZUKI, D. T. ; GRIFFITHS, A. J. F. ; MILLER, J. H. & LEWONTIN, R. C. **Introdução à Genética** (4ed), 1992.
- TATINI, S. R. Influence of foods environments on growth of *Staphylococcus aureus* and production of various enterotoxins. **J. Milk Food Technol.**, 36 (11) : 559-563, 1973.
- TRANter, H. S. Foodborne Illness : Foodborne staphylococcal illness. **The Lancet**, 27 : 1044-1046, 1990.
- TSEN, H. -Y. & CHEN T. -R. Use of the polymerase chain reaction for specific detection of type A, D and E enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in foods. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 37 : 685-690, 1992.

- ÜNAL, S. ; HOSKINS, J. ; FLOKOWITSCH, J. E. ; WU, C. Y. E. ; PRESTON, D.A. & SKATRUD, P. L. Detection of methicillin-resistant *Staphylococci* by using the polymerase chain reaction. **J. Clin. Microbiol.**, **30** (7) : 1685-1691, 1992.
- VALLE, J. ; GOMEZ-LUCÍA, E. ; PIRIZ, S. et al. Enterotoxin production by *Staphylococci* isolated from healthy goats. **Appl. Environ. Microbiol.**, **56** (5) : 1323-1326, 1990.
- VAN BELKUM, A. DNA fingerprinting of medically important microorganisms by use of PCR. **Clin. Microbiol. Rev.**, **7**(2) : 174-184, 1994.
- VAN BELKUM, A. ; BAX, R. ; PEERBOOMS, P. ; GOESSENS, W. ; VAN LEEUWEN, N. & QUINT, W. Comparison of phage typing and DNA fingerprinting by polymerase chain reaction for discrimination of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. **J. Clin. Microbiol.**, **31** (4) : 798-803, 1993.
- VARADARAJ, M. C. & RANGANATHAN, B. Isolation and characteristics of *Staphylococci* from foods : a review. **J. Food Sci. Technol.**, **22** : 378-386, 1985.
- VARADARAJ, M. C. & RANGANATHAN, B. Staphylococcal enterotoxins - methods of production and detection - A Review. **Indian J. Dairy Sci.**, **42** (2) : 267-277, 1989.
- WELSH, J. & McCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucl. Ac. Res.**, **18** (24) : 7213-7218, 1990.

WILLIAMS, J. G. K. ; KUBELIK, A. R. ; LIVAK, K. J. ; RAFASLKI, J. A. & TINGEY, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucl. Ac. Res.**, **18** (22) : 6531-6535, 1990.

WILSON, I. G. ; COOPER, J. E. & GILMOUR, A. Detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in dried skimmed milk : use of the polymerase chain reaction for amplification and detection of staphylococcal enterotoxin genes *entB* and *entC*, and the thermonuclease gene *nuc*. **Appl. Environ. Microbiol.**, **57** (6) : 1793-1798, 1991.

YOUNG, K. A. ; POWER, E. G. M. ; DRYDEN, M. S. & PHILLIPS, I. RAPD typing of clinical isolates of *Staphylococcus haemolyticus*. **Lett. Appl. Microbiol.**, **18** : 86-89, 1994.