

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIENCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E
ESTRUTURAL APLICADAS

FERNANDO VIEIRA RODRIGUES

SELEÇÃO DE PEPTÍDEOS LIGANTES A *Staphylococcus aureus*:
OBTENÇÃO DE NOVAS FERRAMENTAS DIAGNÓSTICAS DE
CONTAMINAÇÕES ALIMENTARES

Uberlândia, MG, Março de 2013

FERNANDO VIEIRA RODRIGUES

**SELEÇÃO DE PEPTÍDEOS LIGANTES A *Staphylococcus aureus*:
OBTENÇÃO DE NOVAS FERRAMENTAS DIAGNÓSTICAS DE
CONTAMINAÇÕES ALIMENTARES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia. Como requisito para obtenção do título de mestre em Biologia Celular.

Área de Concentração: Caracterização molecular de Micro-organismos e Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Tatiana Amabile de Campos.

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Yara Cristina de Paiva Maia.

Uberlândia, MG, março de 2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

R696s Rodrigues, Fernando Vieira, 1985-
2013 Seleção de peptídeos ligantes a *Staphylococcus aureus*: obtenção de novas ferramentas diagnósticas de contaminações alimentares / Fernando Vieira Rodrigues. -- 2013.
63 f. : il.

Orientadora: Tatiana Amabile de Campos.
Coorientadora: Yara Cristina de Paiva Maia.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural
Aplicadas.
Inclui bibliografia.

1. Citologia - Teses. 2. Peptídeos - Teses. 3. Intoxicação alimentar - Teses. 4. Segurança alimentar - Teses. 5. Estafilococos áureos - Teses. I. Campos, Tatiana Amabile de. II. Maia, Yara Cristina de Paiva. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas. IV. Título.

CDU: 576.3

DEDICATÓRIA

Aos meus pais,

exemplos de caráter, humildade e fé, por todo carinho, preocupação e amor, por estarem
sempre presentes.

A todos meus amigos que tive contato durante toda minha Pós-graduação.

A vocês, agradeço e dedico minha alegria.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Manoel Rodrigues Filho e Gislaine Aparecida Vieira Rodrigues, pela minha vida, por tudo que me propiciaram e ensinaram e pela paciência com minhas dificuldades durante o andamento do curso e a ansiedade própria dos momentos que antecedem sua conclusão.

Aos meus irmãos Patrícia Vieira Rodrigues e Flávia Vieira Rodrigues e a todos os demais parentes.

A minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Tatiana Amabile de Campos, pela paciência e confiança, mas, sobretudo pelo respeito.

À minha co-orientadora, Prof^a. Dr^a. Yara Cristina de Paiva Maia, pelas orientações, sábias sugestões e pela amizade.

Ao Prof. Dr. Luiz Ricardo, pela oportunidade de trabalhar no Laboratório de Nanobiotecnologia da UFU.

Ao Prof. Dr. Carlos Ueira, pelas grandes ideias compartilhadas para elaboração do meu projeto de dissertação.

Aos alunos do laboratório de Nanobiotecnologia, Eliza, Emília, Lara, Carol Reis, Mayara, Léa, Fabiana Santos, Patrícia Terra e Patrícia Tyeme e todas as outras pessoas do NANOs, pela amizade e ajuda em experimentos e agregação de conhecimentos.

Aos colegas dos laboratórios vizinhos, Guilherme Duarte dos Santos Lemos, Letícia Ramos de Arvelos, Lúbia Cristina Fonseca, e os demais colegas pela amizade e atenção.

Aos meus companheiros de mestrado: Marlus Alves Santos e Emerson Nunes Costa.

À UFU, ao CNPQ, CAPES e FAPEMIG por terem oferecido a estrutura e financiamento para a realização desse trabalho.

À Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas pela confiança e oportunidade de buscar essa conquista.

“Até mesmo a menor das pessoas pode mudar o rumo do futuro”
(TOLKIEN, 1954)

RESUMO

O consumo de alimentos contaminados com cepas de *Staphylococcus aureus* pode causar doenças, cujos sinais incluem gastroenterites, náuseas, vômitos, diarreia, dor abdominal intensa dentro de uma a seis horas após o consumo do alimento contaminado. Por esta razão, métodos rápidos de detecção de *S.aureus* são essenciais para o controle da qualidade e da garantia da segurança alimentar. Assim, o presente estudo teve por objetivo selecionar peptídeos ligantes à *S.aureus*, por meio da técnica de *Phage Display* (PD), para desenvolvimento de ferramentas diagnósticas rápidas, de fácil manipulação e baixo custo. Neste estudo, foi realizado *biopanning* para seleção de peptídeos expressos na superfície de fagos filamentosos que apresentassem peptídeos ligantes a *S.aureus*. O DNA dos fagos selecionados foi sequenciado e submetido a análise *in silico*(BioEdit v7.0.9). As sequências obtidas foram alinhadas e os clones foram submetidos à *pre-screening* (ELISA) para avaliação de especificidade de ligação à *S. aureus*. Os títulos de entrada e saída obtidos no *biopanning* foram constantes. Nove sequências válidas foram obtidas após o sequenciamento dos 40 clones selecionados após 3 ciclos de *biopanning*. A análise de reatividade demonstrou que quatro clones apresentaram reatividade à bactéria, embora os testes de especificidade demonstraram que os peptídeos não exibiram capacidade de ligação específica a *S. aureus*. Apesar disto, o peptídeo E06 mostrou especificidade de ligação a bactérias do gênero *Staphylococcus* usadas no teste de reatividade. Além disso, as análises *in silico* revelaram que os peptídeos recombinantes compartilham características químicas essenciais a proteínas das bactérias. Embora a especificidade a *S.aureus* não tenha sido observada, neste estudo o peptídeo pode ser utilizado como um método de detecção a contaminação de alimentos por estafilococos. Nas contaminações de alimentos, a triagem rápida e métodos de identificação de grupos bacterianos permitem estabelecer decisões sobre a comercialização e distribuição e podem prevenir um surto de intoxicação, garantindo a segurança alimentar.

Palavras-chave -*Phage display*, segurança alimentar; intoxicação alimentar, Gram-positivas.

ABSTRACT

Consumption of food contaminated with strains of *Staphylococcus aureus* can cause diseases, whose signs and symptoms include gastroenteritis, nausea, vomiting, diarrhea, abdominal pain within one to six hours post-consumption of contaminated food. In this way, rapid methods of detection and identification of *S. aureus* are essential for food quality control and food safety. At this study, objective was to select peptide that binds to *S. aureus*, through the technique of Phage Display (PD), for development of fast diagnostic tools, of easy handling and low cost. At this study was used biopanning for selection of peptides that express on the surface filamentous phage peptides that binds to *S. aureus*. The phage DNA selected was sequenced and subjected to *in silico* analysis (BioEdit v7.0.9). The sequences obtained were aligned and clones underwent pre-screening (ELISA) for the evaluation of binding specificity to *S. aureus*. The titles of input and output in biopanning were constant. Nine valid sequences were obtained after sequencing 40 clones selected after 3 rounds of biopanning. The analysis demonstrated that four clones presented reactivity in bacteria, although tests have demonstrated that the peptides exhibited no specific binding capacity in *Staphylococcus aureus*. Nevertheless, the peptide H06 showed binding specificity in gram-positive bacteria used in the test of reactivity. Furthermore, the *in silico* analysis showed that the recombinant peptides share chemical characteristics essential the proteins of the bacterial cells. Although the *S. aureus* specificity had not been observed, the peptide can be used as a method of detecting contamination of food in gram-positive bacteria. In food contamination, fast screening and identification of bacterial groups, allows establish decisions about the marketing and distribution of foods and may prevent outbreaks of food intoxication and ensure food security.

Keywords – Phage display, food safety, food intoxication, Gram-positive.

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Graus Celsius
<i>agr</i>	Gene Codificador de Proteína Agr
Agr	Proteína Reguladora de Genes Acessórios
AIP	Peptídeo Auto-indutor
BSA	Soro albumina bovina
Ccr	Cromossomo Cassete Recombinase
DNA	Acido desoxirribonucleico
DTA	Doenças Transmitidas por Alimentos
EDTA	Ácido Tetra Diamino Etileno
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
ER2738	<i>Escherichia coli</i> estirpe 2738
Gene (tstH)	Gene codificador da TSST-1
HCl	Acido clorídrico
HLG	Gama-hemolisina
<i>Hlg</i>	Gene codificador da gama-hemolisina
IPTG	Isopropil b-D-tiogalactoside
kDa	Quilodalton
L	Litro
LB	Meio de cultura Luria-Bertania
<i>Lpl</i>	Agrupamento Gênico de Lipoproteina
Luk	Leucocidina
<i>Luk</i>	Gene codificador da leucocidina
<i>mec</i>	Determinantes Gênicos de Resistência à Meticilina
MgCl ₂	Coreto de Magnesio
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> Resistente à Meticilina
MS	Ministério da Saúde
MSCRAMMs	Componentes da Superfície Microbiana que Reconhecem Moléculas da Matriz Adesiva
NaCl	Cloreto de Sódio
NaHCO ₃	
OD	Densidade óptica
ORF's	<i>Open Reading Frames</i>
PAI	Ilhas de Patogenicidade
PBP	Proteína Ligadora de Penicilina
PBS	Tampão Fosfato Salino
PBST	Tampão fosfato Salino com Tween
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PEG	Polietileno Glicol
pH	Produto hidrogenionico

PhD	Phage Display
pIII	Proteína III do bacteriófago Filamentoso
pIX	Proteína IX do bacteriófago Filamentoso
PTSAgs	Toxinas Pirogênicas com Ativade de Superantígenos
pVI	Proteína IV do bacteriófago Filamentoso
pVII	Proteína VII do bacteriófago Filamentoso
pVII	Proteína VIII do bacteriófago Filamentoso
PVL	Leucocidina Panton- Valentine
SAGS	Superantígenos
SAPIbov	Ilhas de Patogenicidade de <i>Staphylococcus aureus</i> em Bovinos
SAPIs	Ilhas de Patogenicidade de <i>Staphylococcus aureus</i> em humanos
SCCs	Cromossos cassetes de <i>Staphylococcus aureus</i>
SEA-SEU	Enterotoxinas de <i>Staphylococcus</i> de A-U
<i>Ssl</i>	Genes Semelhantes a Superantígenos de <i>Staphylococcus</i>
SVS	Vigilância Sanitária em Saúde
TCR	Receptor de Célula T
Tris	2amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol
TSS	Síndrome do Choque Tóxico
TSST-1	Toxina da Síndrome do Choque Tóxico
UFC	Unidade Formadora de Colônia
VE-DTA	Vigilância Epidemiológica das DTA
µg	Microgramas
Ml	Microlitros
µm	Micrômetro

LISTA DE AMINOÁCIDOS

A	Alanina
C	Cisteína
D	Ácido Aspártico
E	Ácido Glutâmico
F	Fenilalanina
G	Glicina
H	Histidina
I	Isoleucina
L	Isoleucina
M	Metionina
N	Asparagina
P	Prolina
Q	Glutamina
R	Arginina
S	Serina
T	Treonina
V	Valina
W	Triptofano
Y	Tirosina

LISTA DE FIGURAS

Figura1	Mecanismo de <i>Quorum-Sensing</i> de <i>Staphylococcus aureus</i> .	13
Figura2	Surtos de DTA por ano e número de doentes no Brasil.	15
Figura3	Número de surtos de DTA notificados no sistema VE-DTA por unidade federada.	16
Figura4	Desenho esquemático da estrutura do fago filamentoso.	18
Figura5	Procedimento típico do <i>biopanning</i> .	19
Figura6	Eletroforese em gel de agarose 0,8% (v/v) impregnado com brometo de etídio (concentração do brometo) contendo DNA fágico extraído após os ciclos de <i>Biopanning</i> .	28
Figura7	Ensaio Imunoenzimático (ELISA) de reatividade do clone E06 frente às cepas de bactérias Gram-negativas e Positivas.	30
Figura8A	Alinhamento tridimensional do clone E05 com Proteína Sars de <i>Staphylococcus aureus</i> .	33
Figura8B	Alinhamento tridimensional do clone G09 com Fator Suposta5'-nucleotidase de <i>Staphylococcus aureus</i> em complexo com alfa-cetoglutarato	33

LISTA DE TABELAS

Tabela1	Agentes etiológicos mais frequentes em surtos de DTA no Brasil.	16
Tabela2	Seleção de fagos com peptídeos ligantes à <i>Staphylococcus aureus</i> . Título obtido (pfu) no processo de seleção.	28
Tabela3	Sequências encontradas a partir dos clones selecionados no <i>Biopanning</i> e suas respectivas frequências.	29
Tabela 4	Relação dos peptídeos e com respectivos valores de p em relação ao fago selvagem.	32

SUMÁRIO.....	xv
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	1
2.1. Intoxicações alimentares	1
2.2. O gênero <i>Staphylococcus</i>	2
2.3. <i>Staphylococcus aureus</i>	2
2.4. Patogenia de <i>Staphylococcus aureus</i>	3
2.5. Toxinas de <i>Staphylococcus aureus</i>	3
2.6. Toxina alfa	3
2.7. Toxina beta.....	4
2.8. Toxina delta.....	4
2.9. Leucotoxinas	5
3. Enterotoxinas de <i>Staphylococcus</i> (SE).....	6
3.1. Toxina da Síndrome do Choque Tóxico (TSST-1).....	7
3.2. Genética da patogenicidade <i>Staphylococcus aureus</i>	9
3.3. Cromossomos cassete de <i>Staphylococcus aureus</i>	9
3.4. Ilhas genômicas em <i>Staphylococcus aureus</i>	10
3.5. Ilhas de Patogenicidade (PAIs) em <i>Staphylococcus aureus</i>	11
3.6. Mecanismo de Quorum Sensing em <i>Staphylococcus aureus</i>	12
3.7. <i>Quorum sensing</i> relacionado à formação de biofilmes em <i>S.aureus</i>	13
3.8. Intoxicação alimentar por <i>Staphylococcus aureus</i>	14
3.9. Epidemiologia dos surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil	14
4. Metodologias de detecção de <i>Staphylococcus aureus</i>	17
4.1. Tecnologia de <i>Phage display</i>	18
5.OBJETIVOS	21
5.1. OBJETIVO GERAL	21
5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
6. METODOLOGIA	22
6.1. Local do estudo	22
6.2. Material Biológico	22

6.3. Seleção de peptídeos ligantes à <i>Staphylococcus aureus</i>	22
alvos analisados. Foram realizados três ciclos de seleção por meio de triagem subtrativa. ...	22
6.4. Amplificação dos fagos	23
6.5. Titulação	24
6.6. Extração de DNA.....	24
6.7. Sequenciamento do DNA.....	25
6.8. Ensaios Imunoenzimáticos (ELISA).....	25
6.9. Análise <i>in silico</i> dos petídeos obtidos no <i>Biopanning</i>	26
7. Analise estatística.....	26
8. RESULTADOS	27
8.1. Seleção de peptídeos ligantes à <i>Staphylococcus aureus</i>	27
8.2. Ensaio Imunoenzimático (ELISA).....	28
8.3. Análise estatística da reatividade do peptídeo E06	30
8.4. Análise <i>in silico</i> dos peptídeos selecionados	30
10. CONCLUSÕES	38
11. REFÊRENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39

1. INTRODUÇÃO

Staphylococcus aureus é um importante patógeno bacteriano causador de contaminações alimentares. Diversos alimentos como leite, queijos, cremes, manteigas, salsichas, carne enlatada e saladas são considerados um bom meio de cultura para *Staphylococcus* e frequentemente estão associados a casos de intoxicação por essa bactéria. *S. aureus* também atua como um importante agente de infecções hospitalares em todo mundo, causando uma ampla gama de infecções, variando desde aquelas localizadas, geralmente superficiais, até algumas disseminadas, com elevada gravidade. Além de infecções hospitalares e intoxicações alimentares, *Staphylococcus aureus* é o principal patógeno causador de mastite em bovinos e pequenos ruminantes. A sua frequência é elevada levando a perdas econômicas, devido a diminuição da produção de leite. Além disso, contaminação por *Staphylococcus* é um problema de saúde pública, uma vez que este alimento pode veicular micro-organismos, toxinas e resíduos antimicrobianos que comprometem a saúde da população. Devido a grande importância dos *S. aureus* para a saúde pública, torna-se condição *sine qua non* a elaboração e implantação de programas de controle e monitoramento dessas bactérias. Deste modo, o investimento em pesquisas que busquem métodos rápidos de detecção e identificação são essenciais para garantir a segurança dos alimentos, evitar focos de intoxicação alimentar e interromper a cadeia bacteriana epidemiológica. O presente estudo buscou selecionar peptídeos ligantes à *S. aureus* para o futuro desenvolvimento de ferramentas diagnósticas para identificação da bactéria.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Intoxicações alimentares

As contaminações alimentares são agrupadas em três categorias: Físicas, químicas e biológicas: A de natureza física são ocasionadas por poeira, partículas metálicas e pedaços de vidro; aquelas de natureza química são originadas pela presença de metais pesados diversos, detergentes, pesticidas e antibióticos; e as de natureza biológica são causadas por bactérias, parasitas, vírus, fungos e príons (FRANCO; LANDGRAF, 1996).

As intoxicações alimentares de natureza biológica são agrupadas em duas categorias (BRASIL, 2006): decorrentes da presença de toxinas pré-formadas e da presença de bactérias patogênicas. No primeiro grupo destacam-se *Clostridium botulinum*, *Staphylococcus aureus*,

Bacillus cereus forma emética e fungos produtores de micotoxinas. Entre os patógenos associados às infecções alimentares destacam-se: *Salmonella sp*, *Shigella sp*, *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio Cholerae*, *Campylobacter jejuni* patotipos diversos de *Escherichia coli* (BRASIL, 2006). Estas bactérias aderem e colonizam o epitélio intestinal humano e liberam toxinas causando diarreias e desidratação intensa.

2.2. O gênero *Staphylococcus*

O gênero *Staphylococcus* é caracterizado por apresentar cocos gram-positivos, que possuem arranjo em formas de cachos de uvas, mas podem também ocorrer como células isoladas, aos pares ou em cadeias curtas. A maior parte dos *Staphylococcus* apresenta diâmetro compreendido entre 0,5 a 1 µm, são imóveis, aeróbios ou anaeróbios facultativos, catalase positivos e crescem em meio contendo 10% de cloreto de sódio, em temperatura de 18 a 40 C° e pH 4,0-10. (BAIRD-PARKER, 1990). Além disso, os representantes do gênero apresentam resistência à desidratação e são estáveis durante meses no ambiente (KLUYTMANS, 2010).

Staphylococcus comprehende uma vasta gama de espécies e subespécies amplamente distribuídas na natureza, sendo principalmente encontradas na pele e mucosas de aves e mamíferos (KLOOS; BANNERMAN, 1999). Este gênero foi por muito tempo incluído na família Micrococaceae, porém posteriormente inserido na família Staphylococaceae, após estudos de biologia molecular, perfis de ácidos graxos e composições da parede celular bacteriana (GARRITY, 2006).

Atualmente *Staphylococcus* é constituído por 41 espécies descritas, sendo a maioria coagulase negativa (EUZÉBY, 1997; BANNERMAN, 2003). A enzima coagulase caracteriza e identifica algumas espécies do gênero, por exemplo, o *Staphylococcus aureus*.

2.3. *Staphylococcus aureus*

A espécie *S.aureus*, é a mais importante do gênero *Staphylococcus* relacionada a tóxicos infecções alimentares e às infecções hospitalares em humanos (BANNERMAN, 2003). Além disso, ocorre ubliquamente como colonizador comensal da pele de animais e seres humanos, sendo encontrados em membranas mucosas do trato respiratório, urogenital, digestivo (KLUYTMANS, 2010) e na mucosa nasal de 20 a 40% dos humanos (WERTHEIM *et al.*,

2005). Ademais, é responsável por diversas infecções em gado leiteiro constituindo um agente comumente associado à mastite bovina contagiosa, conduzindo a enormes prejuízos na pecuária de leite (SEARS; MCCARTHY, 2003).

2.4. Patogenia de *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus é responsável por um espectro muito amplo de infecções humanas e diversas espécies animais. Produz e secreta mais de 30 fatores de patogenicidade específicos que interferem com a defesa do hospedeiro (DINGES *et al.*, 2000). Estas infecções podem ser classificadas em localizadas ou disseminadas. As infecções localizadas afetam a pele e os tecidos celulares subcutâneos e, geralmente são decorrentes da invasão direta dos tecidos por amostras de *S.aureus* existentes na pele ou mucosas, por exemplo, pústulas, furúnculos, impetigos, pneumonia, osteomielite, endocardite, meningite. As disseminadas por outro lado podem causar bactеремia e septicemia. As doenças causadas por toxinas também apresentam importantes manifestações clínicas, como celulite, intoxicação alimentar, TSS e síndrome da pele escaldada (CORBELLÀ *et al.*, 1997).

2.5. Toxinas de *Staphylococcus aureus*

Diversos fatores de virulência são responsáveis por conduzir a gravidade das infecções acarretadas por *Staphylococcus aureus*.

Hemolisinas alfa, beta, delta e gama; leucocidinas e superantígenos tóxicos pirogênicos (PTSAgs) são fatores de virulência comprovadamente efetivos na patogenicidade de *Staphylococcus aureus* (LINA *et al.*, 2004).

2.6. Toxina alfa

Os monômeros de alfa-toxina têm a habilidade de se acoplar a membrana das células eritrocitárias, epiteliais, endoteliais, mononucleares, plaquetas, formando hexâmeros ou heptâmeros, conduzido à formação de poros análogos a anéis, os canais hidrofílicos (BHAKDI; TRANUM-JENSEN, 1991). Além disso, alterações na osmolaridade da célula e apoptose são efeitos decorrentes da formação desses poros (BOACH; FOSTER, 2000). A

toxina alfa ainda apresenta a capacidade de ativar fosfolipídios e o metabolismo do ácido araquidônico, gerando prostaglandinas e leucotrienos. A síntese desses compostos resulta em efeitos vasoativos que aumentam a letalidade direta das células endoteliais pela alfa-toxina (BOACH; FOSTER, 2000).

2.7. Toxina beta

A beta-toxina é uma esfingiomelinase neutra, que é análoga à alfa-toxina e tem a capacidade de promover a lise eritrocitária dependente da espécie, sendo os eritrócitos de ovinos, caprinos e bovinos mais suscetíveis à ação desta enzima. A sensibilidade à ação da toxina beta depende do conteúdo de esfingiomelina presente na membrana do eritrócito, o qual é hidrolisado a fosforilcolina e a ceramida. Os danos que são ocasionados pela toxina beta ocorrem a partir das invaginações de determinadas regiões da membrana eritrocitária, ao contrário da toxina-alfa que é formadora de poros (BOACH; FOSTER, 2000).

A beta-toxina também exibe efeito citotóxico em monócitos humanos, além de induzir a liberação de citocinas e de moléculas receptoras ancoradas na membrana destas células (WALEV *et al.*, 1996). Ademais, exibe atividade leucotóxica, pela diminuição da viabilidade de células mononucleares e polimorfonucleares humanas (MARSHALL *et al.*, 2000).

Outro papel importante da toxina beta é o de dotar aos organismos a capacidade de adquirir ferro na forma heme (HUSEBY *et al.*, 2007). O ferro é um micronutriente limitante para todos os organismos e é necessário em muitos processos biológicos. *Staphylococcus aureus* apresenta um sistema multicomponente de obtenção de heme de hemoglobina do hospedeiro de onde extraí o ferro fundamental para um bom funcionamento do seu metabolismo (TORRES *et al.*, 2006).

2.8. Toxina delta

A toxina delta consiste em um peptídeo que apresenta efeito citotóxico para células eritrocitárias e outras células por meio de danos a membrana celular. O modo como esta toxina causa danos nas células é por meio da formação de canais na membrana compostos por seis moléculas de gama-toxina (BOACH; FOSTER, 2000). A toxina delta é única em seu pequeno tamanho, estabilidade ao calor, propriedades surfactantes e lítica para vários tipos de

membranas da maioria das espécies animais, incluindo eritrócitos, outras células e organelas. Além disso, provoca extravasamento citoplasmático e lise das células expostas a essa toxina (BOACH; FOSTER, 2000).

2.9. Leucotoxinas

Um dos principais fatores de virulência que *Staphylococcus aureus* utiliza para neutralizar neutrófilos *in vitro* é a produção de leucotoxinas formadora de poros e bi-competentes (MENESTRINA *et al.*, 2003). Alguns membros dessas leucotoxinas apresentam uma distribuição epidemiológica e associação clínica com diversas doenças humanas e com mastite bovina (BARRIO *et al.*, 2006). Pelo menos cinco subunidades da classe S (LukS-PV, HlgA, HlgC, LukE e LukM) e quatro subunidades da classe F(LukF-PV, HlgB, LukD e LukF'-PV) foram descritas em *Staphylococcus aureus* (PREVOST *et al.*, 2001). Membros da Classe S reconhecem receptores celulares que não produzem resposta celular, mas possibilitam que membros da classe F, em conjunto com outros componentes F, associam-se em complexos hexa ou octaméricos que ativam a atividade biológica (PREVOST *et al.*, 2001). Quatro *loci* codificadores de leucotoxinas bi-competentes: *hlg*, *pvl*, *LukE-LukD*, *LukM-LuKF*-PV foram caracterizados. O locus *hlg* codificador de gama-hemolisina, é constituído por três ORF's que comprehendem os genes *hlgA*, *hlgB* e *hlgC*. As subunidades HlgA e HlgC pertencem a classe S e a HlgB, a classe F. Dessa forma, cepas portadoras do locus *hlg* podem formar duas combinações para formação de toxina: HlgB e HlgA ou HlgB e HlgC. No caso da leucocidina Panton-Valentine, o locus codificador é o *Luk*-PV que possui como subunidade S LukS-PV e F, o LuKF-PV (GRAVET *et al.*, 1998). As Leucocidina Panton-Valentine (PVL) produzidas por *Staphylococcus aureus* podem causar diversas doenças, como infecções superficiais de pele e condições sistemáticas como osteomielite, choque séptico e pneumonia necrozante, sendo também relacionadas à leucopenias e extensas necroses pulmonares (LABANDEIRA-REY *et al.*, 2007). A leucocidina Panton-Valentine (PVL) é uma exotoxina bi-competente formadora de póros em células do sistema imunológico como os neutrófilos polimorfonucleares (LABANDEIRA-REY *et al.*, 2007). A forma ativa de PVL requer associação com dois polipeptideos, LuKS-PV e LuKF-PV em um canal de poro heteroligomérico (LABANDEIRA-REY *et al.*, 2007).

3. Enterotoxinas de *Staphylococcus* (SE)

As enterotoxinas de *Staphylococcus* (SEs) pertencem a uma família composta por mais de 20 diferentes exotoxinas funcionalmente relacionadas e apresentam sequências conservadas (PINCHUK *et al.*, 2010). Essas proteínas bacterianas são conhecidas por serem piogênicas e estão associadas a diversas doenças incluindo intoxicações alimentares e síndrome do choque tóxico. Elas são produzidas principalmente por *S.aureus*, embora outras espécies também apresentem potencial enterotoxigenico (PINCHUK *et al.*, 2010). As SEs são os principais agentes de intoxicação por *Staphylococcus* em humanos e têm sido relatadas em vários surtos de contaminação alimentar. Foram identificadas até o momento 20 tipos de enterotoxinas de acordo com sua antigenicidade: SEA, SEB, SEC1, SEC2, SEC3, SED, SEE, SEG, SEH, SEI, SEJ, SEK, SEL, SEM, SEN, SEO, SEP, SEQ, SER, SEU (BALABAN; RASOOLY, 2000; BANIA *et al.*, 2006; CHIANG *et al.*, 2008; MORANDI *et al.*, 2007; OMOE *et al.*, 2005). As enterotoxinas de *Staphylococcus* (SEs) apresentam forma elíptica com dois domínios desiguais, são compostas por uma grande quantidade de cadeias β e poucas α-hélices e são solúveis em água. São monoméricas, com comprimento variando de 220-250 aminoácidos e peso molecular de aproximadamente 25 kDa, apresentando variabilidade significativa de sequência (WATANABE *et al.*, 1989). Além disso, as enterotoxinas de *Staphylococcus* são classificadas como superantígenos, por sua capacidade de estimular células T e consequentemente levar a produção exacerbada de citocinas (BALABAN; RASOOLY, 2000).

As enterotoxinas de *Staphylococcus* apresentam a habilidade de resistir ao calor e ação de enzimas proteolíticas como tripsina, renina e papaína o que permite sua passagem pelo trato gastrointestinal sem perda de sua atividade biológica (HUY, 1994). A quantidade de enterotoxina necessária para desencadear uma tóxico-infecção alimentar é de aproximadamente 1ng/g de toxina. Contudo, fatores como idade, massa corpórea e condições físicas do hospedeiro influenciam o desenvolvimento dos sintomas (BENNETT; MONDAY, 2003). O número de células de *Staphylococcus* capazes de acarretar a um quadro clínico de gastroenterite é de aproximadamente 10⁶UFC/g ou ml, sendo a enterotoxina A mais frequentemente envolvida em surto de toxicó-infecções alimentares (JAY, 2005).

Os genes codificadores das enterotoxinas foram identificados e caracterizados, e a suas denominações iniciam com a letra *ent* de enterotoxina ou *se* de enterotoxina de *Staphylococcus* (FREITAS *et al.*, 2004). Atualmente existem 19 genes SEs descritos que estão

organizados de maneira agrupada no genoma formando *clusters* genéticos (VARSHNEY *et al.*, 2009).

A ampla gama de genes se em *Staphylococcus aureus* sugere que a ocorrência de transferência horizontal de genes de virulência que conduzem a patogenicidade entre as linhagens bacterianas é frequente e ocorre em ambientes onde os hospedeiros são co-infectados ou colonizados por mais de uma cepa bacteriana da espécie. Esses genes são carreados por fagos, plasmídeos e cromossomos em ilhas genômicas (LETERTRE *et al.*, 2003). As enterotoxinas melhor caracterizadas são SEA, SEB, SEC, SED e SEE, as quais são denominadas de enterotoxinas clássicas. SEA, SED e SEE apresentam de 70-90% de sequências conservadas, enquanto SEB e SEC apresentam de 40-60% de identidade. A detecção do gene *sea* em isolados de *Staphylococcus aureus* é importante, pois a enterotoxina SEA é tóxica em baixas concentrações (EVENSON *et al.*, 1988). Além disso, é a enterotoxina mais comumente envolvida em toxo-infecções alimentares seguida apenas das SEB e SED (BALABAN; RASOOLY, 2000).

O gene *seb* é constituído de 798 nucleotídeos e codifica uma proteína de 31,4 kD (JOHNS JR; KHAN, 1988). A enterotoxina SEB pode ser considerada como uma potencial arma biológica devido a sua alta superantigenicidade (DINGES *et al.*, 2000). A quantificação de produção de SEB demonstra que a secreção da enterotoxina pode variar em diferentes tipos de cepas de *S. aureus* (VARSHNEY *et al.*, 2009). Outra enterotoxina de grande importância é a SEC que é altamente heterogênea e apresenta variantes denominadas de SEC1, SEC2 e SEC3 codificadas pelos genes *sec1*, *sec2* e *sec3* respectivamente (MARR *et al.*, 1993). As variantes da enterotoxina SEC mais frequentes em toxico-infecções alimentares são as SEC2 e SEC3 (CHEN *et al.*, 2001). A enterotoxina SED, que é codificada pelo gene *sed*, é produzida em baixas quantidades e pode causar toxico-infecções alimentares principalmente em crianças e idosos (KOKAN; BERGDOLL, 1987). A SEE, por outro lado, é codificada pelo gene *see* e apresenta identidade com as enterotoxinas SEA e SED (BALABAN; RASOOLY, 2000). Além disso, aproximadamente 95% dos casos de toxico-infecções alimentares são causados pelas SEs do tipo SEA e SEE (CREMONESI *et al.*, 2005).

3.1. Toxina da Síndrome do Choque Tóxico (TSST-1)

A toxina da síndrome do choque tóxico (TSST-1), uma exotoxina secretada por *Staphylococcus aureus* foi identificada como o principal agente causador da síndrome do

choque toxica (TSS) 25 anos atrás (BERGDOLL *et al.*, 1981). TSST-1 é único em vários aspectos quando comparado a outros membros da família de superantígenos, incluindo sua divergência estrutural e sua especificidade ao TCR V β . TSST1 interage quase que exclusivamente com receptores de células T humanas no domínio variável da cadeia beta (BUONPANE *et al.*, 2007). A interação da TSST-1 com receptores de células T humanas induz a liberação citocinas que provocam choque, uma condição sistêmica grave caracterizada por febre alta, vômito, diarreia, hipotensão arterial, descamação da pele, erupções cutâneas e acometimento de pelo menos mais três sistemas orgânicos (PARRILO *et al.*, 1993). Para que ocorra a síndrome do choque tóxico (TSS) é necessário que o hospedeiro esteja colonizado por uma cepa de *S.aureus* produtora de TSST-1 e que essa toxina encontre uma via de entrada na circulação sanguínea (HERZER, 2001). Em humanos, a TSS pode se manifestar de duas maneiras, a menstrual e a não menstrual. O primeiro modo ocorre em mulheres que possuem a mucosa vaginal colonizada por *S.aureus* produtoras de TSST-1. Já a segunda maneira pode resultar em infecção por *S.aureus* em qualquer local do organismo (MCCORMICK *et al.*, 2001). A TSST-1 também pode estar envolvida casos clínicos como subclínicos de mastite bovina causada por *S. aureus* (JONES; WIENEKE, 1986). A TSST-1 é um polipeptídio de cadeia simples, com atividades biológicas semelhantes a outras toxinas piogênicas (CARDOSO *et al.*, 2000). Apesar dessa toxina não estar envolvida em surtos de contaminação alimentar por *Staphylococcus aureus* como as outras toxinas, essas por possuírem atividade superantigênica, podem causar a forma da TSS não menstrual, pela ativação e proliferação das células T (KLOTZ *et al.*, 2003).

A TSST-1 foi à primeira toxina relacionada com a TSS, sendo que hoje é aceita como a responsável por cerca de 75% dos casos clínicos. É codificada por um gene (tstH) presente nos cromossomos humanos. Este gene pode ser encontrado em nas ilhas de patogenicidade, inserindo-se tanto próximo a *tyrB* (SAPI1), *trp* (SAPI2) e SaPIbov (LINDSAY *et al.*, 1998).

A TSST-1 é produzida em cerca de 100% das estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas das mucosas cervicais e vaginais das mulheres que apresentam TSS, e em aproximadamente 50% dos isolados de outras partes do corpo de pacientes com síndrome do choque toxico de *Staphylococcus* não menstrual (DINGES *et al.*, 2000).

3.2. Genética da patogenicidade *Staphylococcus aureus*

Vários micro-organismos apresentam mecanismos de transferência horizontal incluindo elementos genéticos móveis como os plasmídeos conjugativos, bacteriófagos, transposons, elementos de inserção e ilhas genômicas, assim como mecanismos de recombinação de DNA invasor com o da microbiota local do hospedeiro (HACKER; CARNIEL, 2001). Entre os elementos móveis mais associados ao surgimento de bactérias patogênicas estão ilhas genômicas, em especial as de patogenicidade (SCHMIDT; HENSEL, 2004). Análises genéticas da virulência e da resistência de antimicrobianos em vários isolados clínicos de *Staphylococcus aureus* revelaram que seus genes estão localizados em sequências de profagos, transposons e ilhas genômicas, especificamente PAIs (SCHMIDT; HENSEL, 2004). A avaliação de três sequencias genômicas distintas estirpes de *Staphylococcus aureus* MRSA permitiu a comparação detalhadada estrutura do PAI no micro-organismo. Além disso, existe uma diferença notável entre PAI de *S.aureus* e ilhas de patogenicidade em outras bactérias gram-positivas, que é a presença de grandes agregados gênicos com variação de alelos de toxinas específica, proteases e enzimas envolvidas em patogênese (SCHMIDT; HENSEL, 2004). Devido ao grande número de ilhas de patogenicidade em *Staphylococcus aureus* e a variedade em estrutura e conteúdo dos genes, é provável que a caracterização clínica adicional de isolados conduza ao aumento da detecção de ilhas de patogenicidade nos patógenos (SCHMIDT; HENSEL, 2004).

3.3. Cromossomos cassete de *Staphylococcus aureus*

O principal problema de tratamento de infecções por *Staphylococcus aureus* é a presença de multirresistência a antimicrobianos. Meticilina é o primeiro antibiótico β -lactâmico semissintético, pertencente ao grupo das penicilinas para uso terapêutico. A resistência ao uso de meticilina por estirpes de *S.aureus* MRSA é conferida por proteínas ligantes a penicilina e geralmente é acompanhado por resistência de vários outros antibióticos beta-lactâmicos (SCHMIDT; HENSEL, 2004). Os cassetes cromossomais de *Staphylococcus* (SCCs) são fragmentos relativamente grandes de DNA que sempre são inseridos nos *orfX* gênico no cromossomo de *Staphylococcus aureus*. Os SCCs podem codificar resistência antimicrobiana ou determinante de virulência (MALACHOWA; DELEO, 2010). A ilha genômica do cromossomo cassette *mec* (SCCmec) carreia determinantes gênicos resistentes a

meticilina: *mecI*, *mecR* e *mecA* (SCHMIDT; HENSEL, 2004). O gene *mecA*, confere resistência a meticilina e β-lactâmicos, sendo que a resistência a antibióticos β-lactâmicos é conferida pela produção de uma proteína de ligação a penicilina de baixa afinidade (PBP2a), que não se liga a meticilina e outros antibióticos β-lactâmicos. Como resultados, esses antibióticos não inibem a habilidade PBPs (enzimas transpeptidases) para fazer a ligação cruzada de polímeros de peptidoglicano da parede celular bacteriana (MALACHOWA; DELEO, 2010). Em adição ao gene *mecA*, *SCCmec* codifica o repressor *MecI*, transdutor de sinal β-lactâmico transmembrana *MecR1*, recombinases *CcrA*, *CcrB* e *CcrC* que juntas formam a região J, o que pode também codificar resistência a outros antimicrobianos (MALACHOWA; DELEO, 2010). A integração e excisão de *SSCmec* pelas recombinases ocorre dentro de um local de ligação específico (*attBsc*) no cromossomo de *Staphylococcus aureus* na extremidade 3' de *orfX* (ITO *et al.*, 2003). Baseado na organização do *mec* e genes associados dentro do complexo *SCCmec*, cinco classes diferentes de *SCCmec* (A-E) foram definidas, das quais três (A-C) são as mais comuns em *S.aureus* (MALACHOWA; DELEO, 2010). Três classes do complexo *mec* e quatro diferentes alótipos *ccr* determinam os tipos de *SCCmec* (I-VIII) (MALACHOWA; DELEO, 2010). Esses determinantes de resistência adicionais são frequentemente codificados por plasmídeos, transposons, ou apresentam sequencias de inserção incorporadas nas regiões J de *SCCmec* (ITO *et al.*, 2003).

3.4. Ilhas genômicas em *Staphylococcus aureus*

Três famílias de ilhas genômicas estão presentes entre estirpes de *Staphylococcus aureus* cujos genomas foram sequenciados (MALACHOWA; DELEO, 2010). Essas ilhas genômicas foram nomeadas de vSA α , vSA β , vSA γ , e são flanqueadas por um gene de transposase interrompido a montante pelo sistema parcial de modificação-restrição (RM) tipo I à jusante. Dada às composições das ilhas genômicas (genes de transposase remanescentes e um conteúdo G+C que difere do genoma principal) uma hipótese corrente é que as ilhas genômicas foram adquiridas por elementos moveis (DOBRINDT, 2004). Um RM tipo I comprehende genes do hospedeiro, determinantes de especificidade *hsdR*, *hsdM*, e *hsdS*, mais somente *hsdS* e *hsdM* são encontrados justapostos a ilhas genômicas de *Staphylococcus aureus*. Ambos os segmentos de DNA contribuem para estabilidade das ilhas genômicas dentro do cromossomo de *S.aureus*. O agrupamento gênico de lipoproteínas (lpl) e os genes

semelhantes à superantígenos de *Staphylococcus* (ssl) são encontrados em vSA α (LINA *et al.*, 2004).

A ilha genômica vSA α , também conhecida como SaPIn3/m3 codifica a produção de bacteriocinas, enterotoxinas, hialuronato-liases, e um agrupamento de genes de serina protease (MALACHOWA; DELEO, 2010). A terceira ilha genômica de *Staphylococcus*vSA γ , contém genes que codificam um modulador solúvel fenólico tipo β e um conjunto de genes *ssl* semelhante aos que estão presentes dentro de vSA α (GILL *et al.*, 2005).

3.5. Ilhas de Patogenicidade (PAIs) em *Staphylococcus aureus*

As ilhas de patogenicidade de *Staphylococcus aureus* (SaPIs) possuem um tamanho de 14 a 17 kb. Até o momento, mais de 16 SaPIs foram identificadas e SaPI1 é considerada a principal ilha de patogenicidade. As SaPIs formam uma família com genes nucleares altamente conservados. Entretanto, a SaPIbov2 contém proteínas de adesão Bap, que desempenham um papel crucial em infecções de mastite bovina crônica (MALACHOWA; DELEO, 2010). O gene *tst* é responsável por produzir toxinas da síndrome do choque tóxico de *Staphylococcus* (TSST-1) e está inserido em elementos móveis genéticos distribuídos nas linhagens de *Staphylococcus aureus* (SCHMIDT; HENSEL, 2004). O gene *tst* é carreado pela ilha de patogenicidade SaPI1 que possui comprimento de 15,233 bp e está inserida em um sítio *att_c* próximo ao gene *tyrB*. Algumas das características marcantes de SaPI1 é sua notável mobilidade e instabilidade. É bastante frequente a excisão do SaPI1 do cromossomo e presença de DNA epissomal (não integrado ao genoma das células hospedeiras). Além do locus SaPI1, o locus referido como SaPI2, também pode carregar o gene *tst* (SCHMIDT; HENSEL, 2004). Foi demonstrado, que a transdução de SaPI1 e SaPI2 ocorre por meio de partículas de fagos *helper* e ausência deste, estas ilhas permanecem estavelmente integradas ao cromossomo bacteriano (LINDSAY *et al.*, 1998). Além de PAIs SaPI1, SaPI2 outras ilhas de patogenicidade foram identificadas em *Staphylococcus aureus*, como por exemplo a SaPbov encontrada em cepas de *S.aureus* isoladas de bovinos e uma terceira PAI denominada de SaPI3, embora nessa terceira ilha patogênica o gene *tst* seja ausente (SCHMIDT; HENSEL, 2004).

3.6. Mecanismo de Quorum Sensing em *Staphylococcus aureus*

S.aureus apresentam um mecanismo de sinalização celular por meio de comunicação intercelular que permite a regulação de processo de colonização e da expressão de numerosos fatores de virulência (YARWOOD; SCHLIEVERT, 2003) denominado *Quorum-sensing* (Figura 1). O sistema *Quorum-sensing*, por meio do gene regulador acessório (*agr*), diminui a expressão de várias proteínas de superfície da célula e aumenta a expressão da secreção de muitos fatores de virulência na transição da fase de crescimento exponencial até a fase estacionária *in vitro* (NOVICK, 2003). Dois transcritos primários, RNAII e RNAIII, são gerados pelo lócus *agr* e regulados por promotores P2 e P3 (Figura 1). O *operon* que tem o P2 como promotor possui quatro genes: *agrA*, *agrB*, *agrC* e *agrD*. O *operon* com promotor P3 contém apenas o gene *hld* (hemolisina delta) e o gene para RNA mensageiro denominado RNAIII (YARWOOD; SCHLIEVERT, 2003). Os produtos dos genes *agrB* e *agrD*, as proteínas AgrB e AgrD, se unem formando um peptídeo auto indutor (AIP). A proteína AgrC, produto do gene *agrC*, é uma proteína transmembrana com receptor para AIP (YARWOOD; SCHLIEVERT, 2003). Um polimorfismo na sequência dos genes desse sistema regulador *agr*, que corresponde ao peptídeo auto indutor e seu receptor de membrana correspondente, divide as linhagens de *Staphylococcus aureus* em quatro grupos alélicos diferentes denominados de *agrI*, II, III e IV (JI *et al.*, 1997). O AIP produzido por um grupo pode interferir na expressão do *agr* de outro grupo, promovendo a interferência bacteriana (YARWOOD; SCHLIEVERT, 2003).

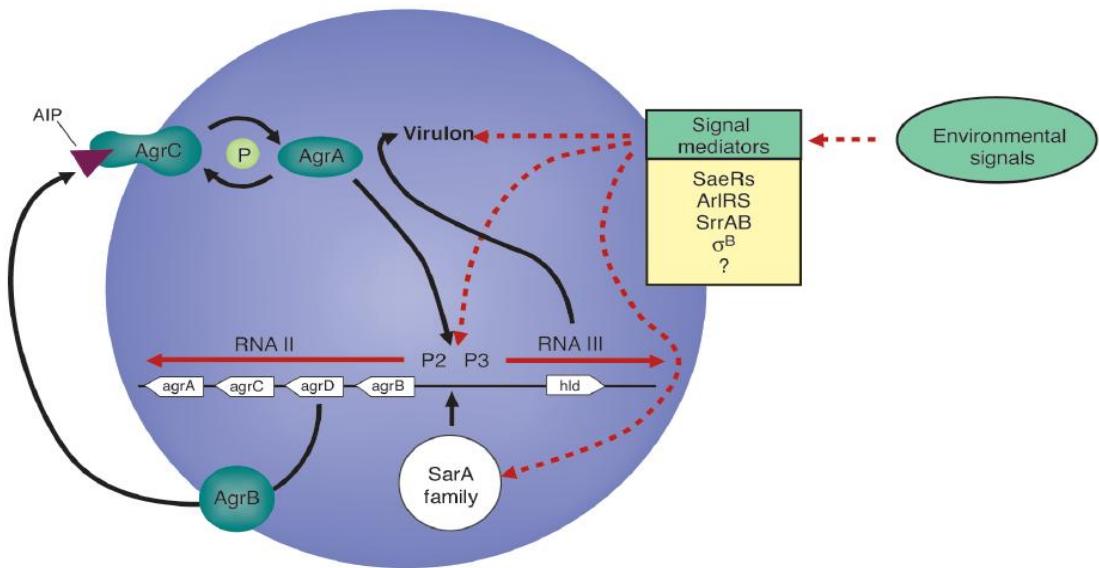


Figura 1 - Mecanismos de *Quorum-sensing* de *Staphylococcus aureus*. O operon P2 codifica via RNAII o mecanismo de sinalização, aonde o transcrito do operon P3, RNAIII, funciona como um efetor molecular do lócus *agr* (YARWOOD; SCHLIEVERT, 2003).

3.7. *Quorum sensing* relacionado à formação de biofilmes em *S.aureus*

Muitas infecções por *S. aureus* são causadas por cepas bacterianas que interagem entre si formando uma estrutura denominada de biofilmes. Biofilmes são agregados de micro-organismos embebidos em uma matriz polimérica e aderidos a uma superfície sólida, formando uma estrutura porosa e altamente hidratada contendo exopolissacarídeos e pequenos canais, abertos entre as microcolônias (LAWRENCE *et al.*, 1991). As estruturas de biofilmes podem ocorrer em equipamentos cirúrgicos, tubulações e alimentos constituindo, desta maneira, uma fonte contaminante. Duas fases de formação de biofilmes em *S. aureus* foram descritas. A primeira envolve a fixação da célula em uma superfície sólida. Essa fase é parcialmente suscetível de ser mediada pela associação de adesinas a superfície, incluindo componentes da superfície microbiana que reconhecem moléculas da matriz adesiva (MSCRAMMs). A segunda fase de desenvolvimento de biofilmes inclui multiplicação celular e formação de uma comunidade madura multicamadas (YARWOOD; SCHLIEVERT, 2003). Há evidências que padrões fenotípicos de *agr* e sua expressão possam influenciar em vários aspectos do comportamento de biofilmes, incluindo a ligação de células a superfícies,

dispersão dos biofilmes e natureza de biofilmes associados a infecções. Muitos dos produtos envolvidos na formação de biofilmes são regulados pelo sistema *agr*.

3.8. Intoxicação alimentar por *Staphylococcus aureus*

Intoxicações alimentares por *S.aureus* são causadas por alimentos ou ingredientes que contém cepas de *Staphylococcus aureus* que produzem SEs. Muitas vezes, erros no preparo e no procedimento de refrigeração do alimento permitem o crescimento bacteriano e consequente produção de enterotoxinas (LOIR *et al.*, 2003). Alimentos diversos, como por exemplo, manteigas, queijos, cremes, leite, salsicha e saladas, são considerados um bom meio de cultura para *S.aureus* e, portanto estão frequentemente envolvidos em doenças transmitidas por alimentos(LOIR *et al.*, 2003). Em alguns países, como por exemplo, Estados Unidos, Europa, Oriente Médio, Índia e América, as contaminações alimentares por *Staphylococcus aureus* são amplamente diversificadas (LOIR *et al.*, 2003). Em muitos casos, a origem da contaminação alimentar encontra-se em não conformidades relacionadas às Boas Práticas de Fabricação (BPF) dos Alimentos, e nas quais falhas na higienização das mãos dos manipuladores de alimentos e podem ser o foco da contaminação alimentar. Por outro lado, infecções dos animais de produção constituem a principal fonte de *S.aureus* em alimentos crus como carne, leite fresco, salsichas e queijo fresco (LOIR *et. al.*, 2003).

3.9. Epidemiologia dos surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil

Com a finalidade de determinar a incidência de DTAs no Brasil, a Secretaria de Vigilância Sanitária em Saúde (SVS) do Ministério da Saúde (MS), implantou no final de 1999 a vigilância epidemiológica das DTA (VE-DTA) em todas as Secretarias Municipais de Saúde das capitais e nas Secretarias Estaduais de Saúde das 27 unidades federadas. Essas secretarias assumiram o compromisso de implementar a VE-DTA em todos os seus municípios (BRASIL, 2004). O início das notificações de surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) ocorreu em 1999; e até 2009, foram notificados ao Ministério da Saúde (MS), 6349 surtos, com o acometimento de 123917 pessoas e registro de 70 óbitos com media de 5 pessoas por surto (Figura 2).

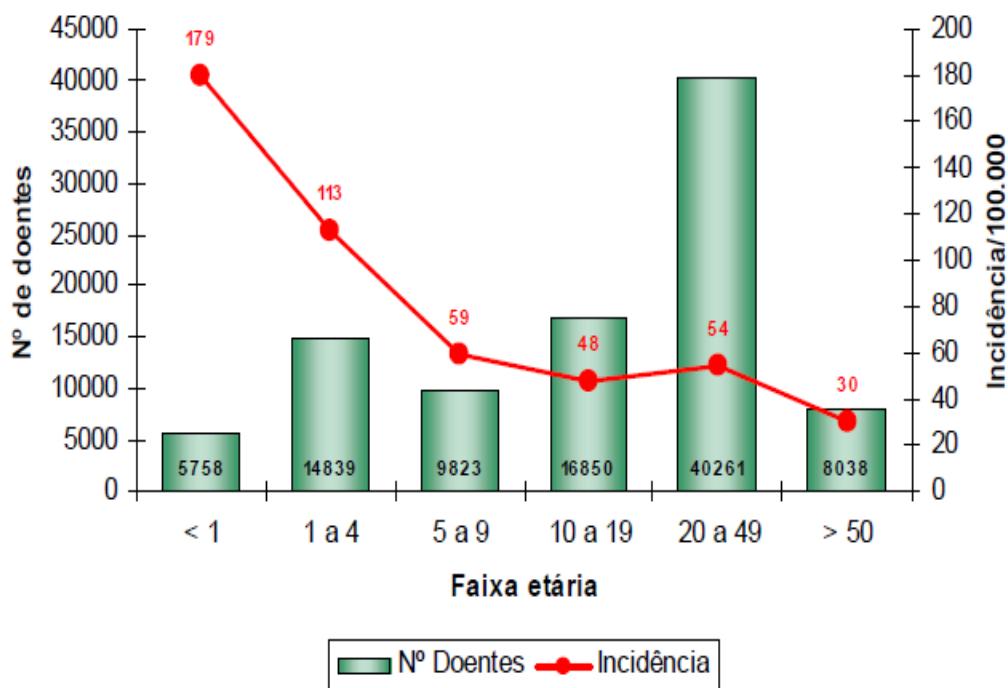


Figura 2 - Surtos de DTA por ano e número de doentes. Brasil, 1999 – 2009. Fonte: COVEH/CGDT/DEVEP/SVS/MS

Entre as 27 unidades federativas do Brasil, aquelas que mais contribuíram com notificações de surtos, desde implementação do VE-DTA, foram: Rio Grande do Sul, com 1921 surtos; São Paulo, com 1394 surtos e Paraná, com 807 surtos (Figura 3).

Dentre os micro-organismos mais envolvidos nos surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil, *Salmonella spp* é o de maior ocorrência seguido por *Staphylococcus spp* que é o segundo micro-organismo mais comumente envolvido em toxicó-infecções alimentar (Tabela 1).

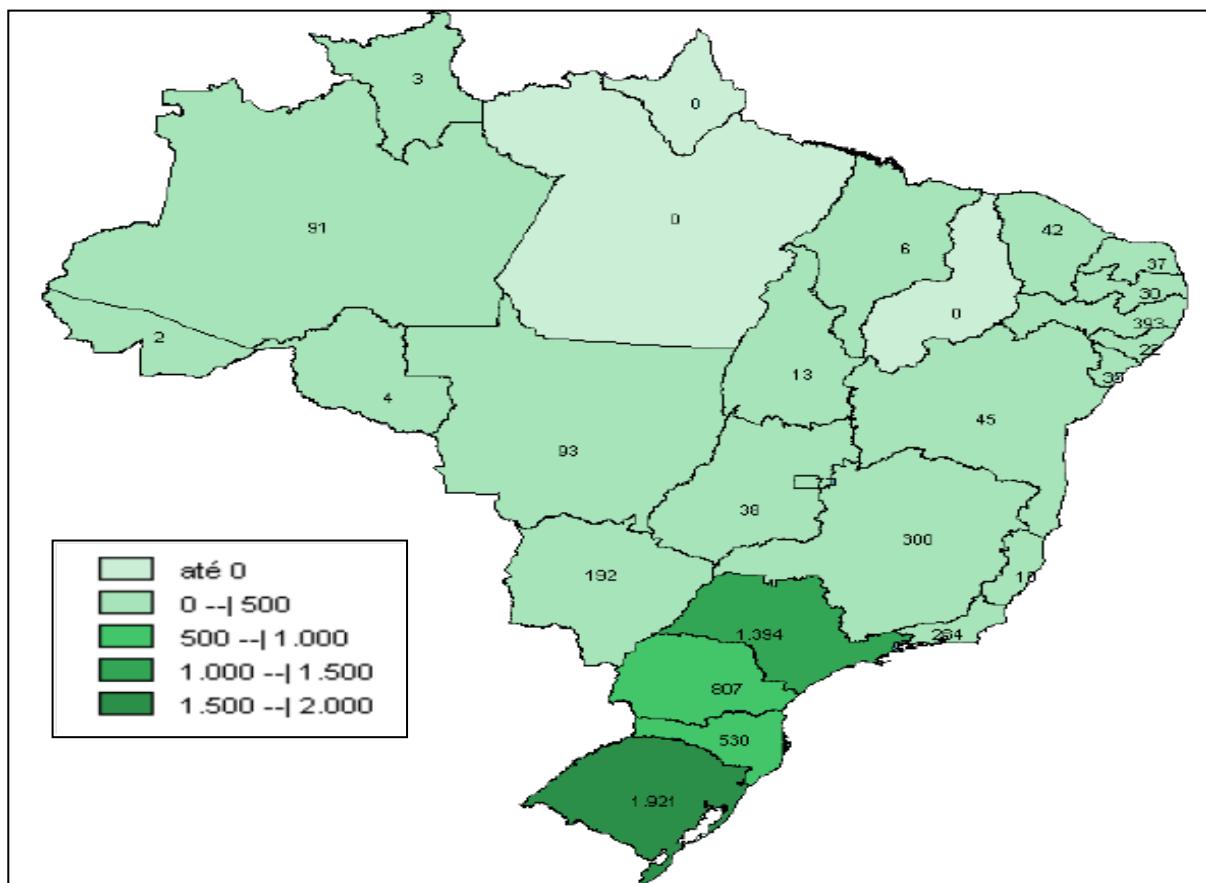


Tabela 1 - Agentes etiológicos mais frequentes em surtos de DTA no Brasil 1999-2009
Fonte: COVEH/CGDT/DEVEP/SVS/MS

Agente etiológico	Nº surtos	%
<i>Salmonella spp</i>	1313	42,5
<i>Staphylococcus spp</i>	635	20,5
<i>Bacillus cereus</i>	219	7,0
<i>Clostridium perfringens</i>	154	4,9
<i>Salmonella Enteritidis</i>	129	4,1
<i>Shigella spp</i>	85	2,7
Outros	553	18,0
Total	3088	100,0

4. Metodologias de detecção de *Staphylococcus aureus*

Diversos métodos são usualmente utilizados para a detecção de *Staphylococcus aureus* em casos de contaminações alimentares, infecções hospitalares e mastite bovina em todo mundo. Entre estas metodologias, são utilizados os diagnósticos laboratoriais convencionais e métodos moleculares.

Os diagnósticos laboratoriais convencionais de *Staphylococcus aureus* são realizados por meio de bacterioscopia, análise de características das colônias e teste de hemólise em meio de culturas de ágar sangue. Vários meios de cultura seletivos como o ágar manitol-salgado, podem ser empregados com a finalidade de isolamento. No entanto, para diferenciar *S. aureus* de outras espécies bacterianas é necessário à realização do teste bioquímico de detecção da enzima coagulase (KONEMAN *et al.*, 2001). Apesar do uso frequente de métodos convencionais para detecção de *Staphylococcus aureus*, nos últimos anos, pode ser observado um grande aumento no uso e desenvolvimento de métodos moleculares para detecção, caracterização e triagem de bactérias em alimentos contaminados. Estes métodos apresentam relevância particular para a indústria alimentar, pois *S. aureus* apresentam a habilidade de produzir enterotoxinas termoestáveis que desencadeiam intoxicação alimentar (DINGES *et al.*, 2000). Além da detecção e identificação de *Staphylococcus aureus* em alimentos contaminados, as SEs também podem ser rotineiramente detectadas. A detecção de enterotoxina de *Staphylococcus* ocorre por métodos como ELISA, imunodifusão, radioimunoensaio, teste de aglutinação. No entanto, estes testes possuem viabilidade limitada para SEA, SEB, SEC, SED e SEE (CREMONESI *et al.*, 2005) e não permitem a identificação bacteriana se a cepa não estiver expressando a toxina no momento do ensaio. Além disso, a sensibilidade e especificidade destes testes são consideradas baixas, dependem de altas quantidades de enterotoxina e são bastante demorados variando de 3 a 24 horas (CHEN *et al.*, 2001). Ainda, outro método bastante utilizado para detecção de SEs de *Staphylococcus aureus*, é a amplificação de sequências específicas dos genes de SEs (HOLECKOVA *et al.*, 2002). Devido ao fato dos *Staphylococcus aureus* estarem envolvidos com a ocorrência de surtos de infecções hospitalares, contaminações alimentares e casos de mastite bovina por todo mundo, métodos de triagem e identificação que permitem estabelecer decisões sobre a comercialização e distribuição são necessários para prevenir surtos de intoxicação e garantir a segurança do consumo de alimento pela população.

4.1. Tecnologia de *Phage display*

Phage Display é uma plataforma de seleção de ligantes com afinidade a moléculas alvos específicas (BRATKOVIC, 2010). As bibliotecas de peptídeos são criadas com as fusões dos mesmos nas proteínas de revestimento dos fagos que estão expostas (HOOGENBOON, 2005).

Os fagos filamentosos M13, fd e f1 expressam cerca de 2700 cópias de proteína principal de revestimento pVIII, expressam aproximadamente 3 a 5 cópias das proteínas pIII, pVI, pVII e pIX (Figura 4) (SIMONS *et al.*, 1981).

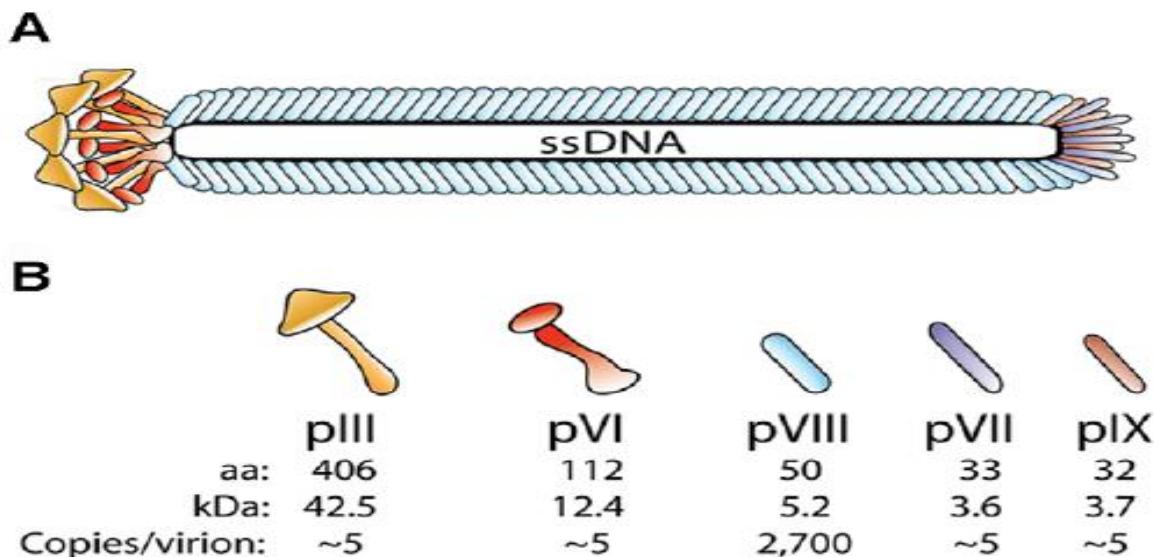


Figura 4 - Desenho esquemático da estrutura do fago filamentoso. (A) O fago é constituído por 5 proteínas estruturais que reveste um DNA de fita simples de cerda de 6,4 kb. (B) O fago tem cerca de 2700 pVIII e cerca de 3 a 5 copias cada uma das quatro proteínas pIII, pVI, pVII, pIX (LØSET *et al.*, 2011).

Alguns estudos descreveram que os polipeptídios já foram fusionados e expressos nas cinco proteínas estruturais, entretanto somente as proteínas pIII e pVIII ganharam uso generalizado na expressão de peptídeos, com exceção da proteína VI que tem sido utilizada amplamente para bibliotecas de cDNA (HUFTON, 1999).

Atualmente, experimentos com alvos fusionados a proteína pVII de fagos *helper*, demonstraram que essa abordagem permite a expressão de sequências heterológas nos fagos filamentosos, além daquelas frequentemente exibidas nas proteínas pIII e pVIII e pode servir como uma metodologia de construção de bibliotecas de peptídeos alternativos às usualmente utilizadas (LØSET *et al.*, 2011). Além disso, foi observado, que é possível combinar o uso de

várias proteínas de fusão para apresentação de peptídeos utilizando genoma baseados em vetores e sistemas fagomídeos (LEE, 2009).

A tecnologia de *Phage Display* é muito eficiente na obtenção de bibliotecas contendo milhões ou até uma quantidade maior de peptídeos ou proteínas. O método mais utilizado é com fagos filamentosos, principalmente o M13. As sequências de DNA de interesse são inseridas em uma localização genômica do bacteriófago, de modo que a proteína codificada é expressa na superfície do fago filamentoso como um produto de fusão a uma das proteínas de superfície do bacteriófago (AZZAY; HIGHSMITH, 2002).

Na técnica de PhD, um fago se liga especificamente ao um alvo, e pode ser selecionado a partir de combinações de milhões de fagos que posteriormente serão recuperados e propagados por amplificação em *E.coli*, que em seguida são submetidos a ciclos adicionais de seleção por afinidade (Figura 5). Todo esse processo é chamado de *Biopanning* (FUKUNAGA; TAKI, 2012).

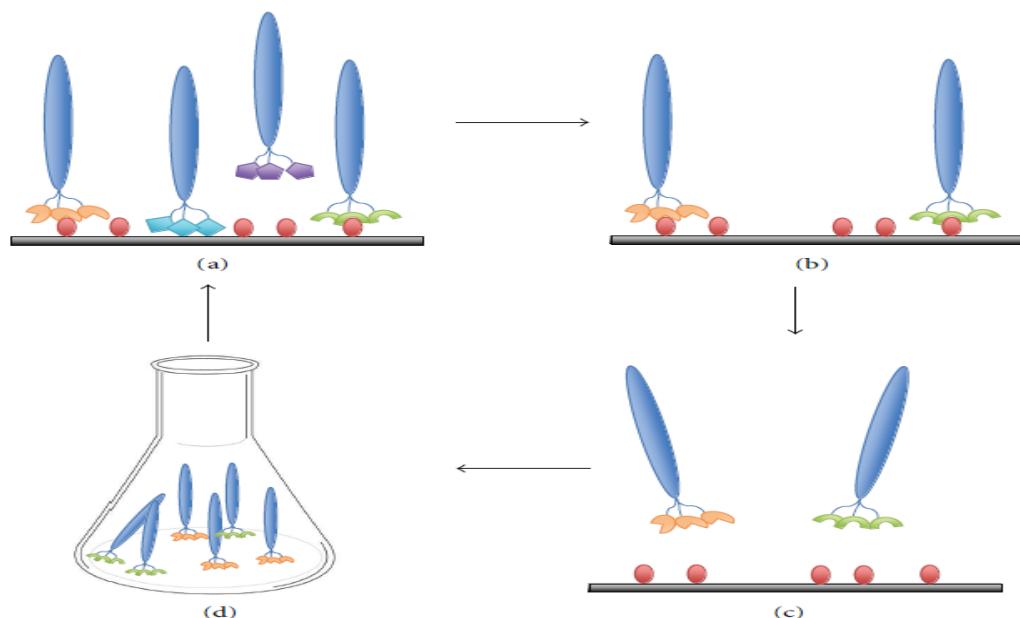


Figura 5 - Procedimento típico de *biopanning*. (a) Incubação de biblioteca de fagos com um alvo imobilizado. (b) Lavagem dos fagos não ligantes. (c) Eluição do alvo ligado ao fago. (d) Amplificação dos fagos eluídos para ciclos subsequentes do *biopanning* (FUKUNAGA; TAKI, 2012).

Ao longo das últimas décadas a técnica de *phage display* tem tido diversas aplicações em biotecnologia, como por exemplo, a descoberta de medicamentos, validação de alvos potenciais a drogas, desenvolvimento de vacinas, seleção de novos anticorpos *in vitro*, proteômica e enzimologia (MOLEK; STRUKELJ; BRATKOVIC, 2011). Além disso, essa

metodologia pode ser usada para construção de biomarcadores a partir da varredura de superfície de células, tecidos ou órgãos (BROWN, 2000).

5.OBJETIVOS

5.1. OBJETIVO GERAL

Selecionar peptídeos ligantes à *S. aureus* para construção de uma plataforma para detecção da bactéria em contaminações alimentares.

5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Selecionar fagos recombinantes, utilizando a tecnologia de PhD para obtenção de peptídeos não ligantes a pools de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.
- Utilizar os peptídeos não ligantes aos *pools* bacterianos testados para selecionar fagos ligantes a *S. aureus*.
- Avaliar a reatividade da ligação dos peptídeos a *S. aureus* e sua especificidade à bactéria.
- Caracterizar os peptídeos expressos na superfície de fagos por meio de análises *in silico*.

6. METODOLOGIA

6.1. Local do estudo

O estudo foi realizado no laboratório de Nanobiotecnologia do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) no período de Abril de 2011 a Maio de 2012.

6.2. Material Biológico

Linhagem padrão de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923); pools de Gram-negativas (*Providencia stuartii*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Salmonella spp*) e pools Gram-positivas (*Streptococcus sp*, *Streptococcus reasus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae* e *Enterococcus faecalis*). Todas as estirpes utilizadas neste estudo foram gentilmente cedidas pelo laboratório de análises clínicas da Universidade Federal de Uberlândia.

6.3. Seleção de peptídeos ligantes à *Staphylococcus aureus*

Para triagem de peptídeos ligantes a moléculas de superfície de *Staphylococcus aureus*, foi utilizada uma biblioteca comercial de peptídeos expressos em fagos M-13: (Ph.D.TM-C7C Phage Display Peptide Library Kit, New England BioLabs, Schwalbach, Alemanha). Os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com protocolo (BARBAS *et al.*, 2001), com adequações realizadas com a finalidade de aumentar a especificidade para os alvos analisados. Foram realizados três ciclos de seleção por meio de triagem subtrativa.

Para o primeiro ciclo, foi preparado uma suspensão bacteriana de 10^9 células/mL previamente cultivada no meio de cultura LB [10 µL de meio (25 mg/mL de meio LB com estreptomicina)] durante 24 horas a 37°C, sob 10.000 rpm. Após esse período, a suspensão foi centrifugada a 10.000 rpm, 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e os "pellets" bacterianos foram diluídos em 2 mL de PBS1X. Após homogeneização, 500 µL da suspensão bacteriana foi transferida para tubo de microcentrífuga (1,5mL) e 10 µL da biblioteca Ph.D.TM-C7C foi acrescido em cada tubo.

Após esse período, os tubos foram centrifugados a 10.000 rpm por 20 minutos. A biblioteca previamente diluída em 500 µL da suspensão bacteriana em meio LB foi submetida primeiramente a seleção negativa com *pool* de bactérias gram-negativas (*Providencia stuartii*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Salmonella spp*) e em seguida esta biblioteca foi incubada no gelo por 1 hora. A suspensão foi centrifugada a 10.000 rpm durante 5 minutos. O sobrenadante foi adicionado ao *pool* de bactérias Gram-positivas (*Streptococcus sp*, *Streptococcus reausus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae* e *Enterococcus faecalis*) e a mistura incubado em gelo por uma hora e centrifugado novamente. O sobrenadante da mistura anterior foi colocado sobre uma suspensão contendo a *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e incubado por uma hora no gelo. A mistura foi centrifugada e lavada por 6 a 10 vezes com PBS1x para exclusão dos fagos não ligantes. Os fagos ligantes foram recuperados por eluição ácida (100 µL de Glicina, pH=2, por 10 min, neutralizada com 15 µL de Tris-HCl, pH=9).

6.4. Amplificação dos fagos

Os bacteriófagos (90 µL) foram amplificados em *Escherichia coli*, linhagem ER2738, em 20 mL de meio LB (*Luria Bertani*), com tetraciclina (20mg/mL) na fase *early-log* ($DO_{600} \sim 0,3$) por 4 a 5 horas, a 37°C, sob agitação. A cultura foi centrifugada (10.000 rpm, 4°C, por 10 minutos). Ao sobrenadante foram adicionados 1/6 de PEG/NaCl (20 mL de LB para 3,3 mL de PEG) e a suspensão foi incubada *overnight* na câmera fria a 4 °C. Após esse período, a solução foi centrifugada para separação dos fagos (10.000 rpm, 15minutos), o sobrenadante foi descartado e o *pellet* resuspensso em 1 mL de PBS1X.

A suspensão foi centrifugada a 10.000 rpm, 4 °C, por 5 minutos, o sobrenadante foi transferido para outro tubo onde foram adicionados 167 µL de PEG/NaCl. Após 1 hora de incubação em gelo (4°C), centrifugou-se a amostra para precipitação dos bacteriófagos (14.000rpm,10minutos, 4°C). No final o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspensido com 100 µL de PBS1X.

6.5. Titulação

Para a realização das titulações foram feitas diluições seriadas, onde foram utilizados 1,0 μ L de clones em 9,0 μ L de meio de cultura LB sucessivamente. As diluições 10^{-1} a 10^{-4} foram feitas para eluatos não amplificado e de 10^{-8} a 10^{-11} , para fagos amplificados. As diluições foram incubadas com 200 μ L de *E. coli* (ER2738) em fase *mid-log* ($DO_{600} \sim 0,5$) por 5 minutos e plaqueadas em meio LB contendo IPTG (0,5 mM) e X-gal (40 μ g/mL), juntamente com 3,0mL de Agarose Top (10g de Bacto-Triptona, 5g de extrato de levedura, 5g de NaCl, 1g de MgCl₂ . 6H₂O / litro) e incubado a 37 °C por 12 horas. Depois da incubação por 12 horas a 37°C, as colônias que apresentaram coloração azul, devido hidrólise do X-Gal pela enzima β -galactosidase presente no fago, foram contadas para determinar os títulos de fagos.

6.6. Extração de DNA

Para a extração do DNA dos fagos, colônias oriundas do 3º ciclo de *Biopanning* foram isoladas e transferidas para poços de placas de cultura (*Deepwell*) com 1,2 mL de cultura de *E. coli* ER2738 em fase *early-log* ($DO_{600} \sim 0,3$). Após isso, a placa foi selada com adesivo perfurado, incubada a 37 °C sob agitação (250 rpm por 24 horas) e centrifugadas (3700 rpm a 20°C por 30 minutos). O sobrenadante (800 μ L), foi transferido para outra placa de cultura (*DeepWell*) para armazenamento do *backup* em glicerol (50% a -20 °C) e os 400 μ L restantes, foram incubados por 10 minutos com 350 μ L de PEG/NaCl. Para precipitação dos fagos foi realizada uma centrifugação de 3700rpm a 20°C por 40 min. Aos fagos adicionou-se 100 μ L de tampão iodeto (10mM de Tris-HCl pH 8, 1mM de EDTA e 4M de NaCl). As placas foram agitadas por 40 segundos e adicionou-se etanol absoluto (500 μ L) para incubação (10min a 37 °C). A seguir, as placas foram centrifugadas a (3700 rpm, a 20 °C por 10min) e o sobrenadante descartado. O DNA extraído dos fagos foi lavado com 150 μ L de etanol 70% e novamente centrifugado. O DNA precipitado remanescente foi diluído com 20 μ L de água deionizada autoclavada. A verificação da qualidade do material extraído foi feita por eletroforese em gel de agarose 0,8% (v/v) corado com brometo de etídeo.

6.7. Sequenciamento do DNA

A reação de sequenciamento foi realizada com o *Kit Big-Dye Terminator* (Applied Biosystems) em termociclador por meio da utilização do *primer* 96 M13 (5'CCCTCATAGTTAGCGTAACG'3) que amplifica a região codante dos peptídeos fusionados aos fagos M13 recombinantes da biblioteca -C7C (*New England*).

O produto da reação foi precipitado e submetido a leitura no equipamento *MegaBACE* (*GE life Science*) para obtenção da sequência de DNA dos fagos selecionados. A dedução das sequências de aminoácidos obtida no sequenciamento foi feita por meio do software BIOEDIT versão 7.0.9 (HALL, 1999).

6.8. Ensaios Imunoenzimáticos (ELISA)

A fim de verificar a reatividade dos clones obtidos no *biopanning*, foi realizado um *pre-screening* frente à estirpe padrão de *Staphylococcus aureus* (ATCC25923) para selecionar os clones mais reativos. Inicialmente foi realizada a amplificação dos sobrenadantes dos fagos obtidos utilizando o fago anti-M13 seguida da revelação por ELISA descrita em mais detalhes a seguir. Os sobrenadantes de cultura dos clones selecionados no *Biopanning* foram submetidos à análise prévia frente à estirpe padrão de *Staphylococcus aureus* (ATCC25923). Primeiramente foi realizada a adsorção, onde cada poço de placas de ELISA (Nunc-Polisorb) foram sensibilizadas com 10 µL de suspensão bacteriana de *Staphylococcus aureus* (1×10^8 UFC/ mL) com 40 µL de tampão bicarbonato (0,1M NAHCO₃ pH 8,6) e foi incubada em overnight a 4 °C. Após esse período, a placa foi bloqueada com 300 µL de BSA 5% por uma hora a 37 °C. A placa foi lavada uma vez com PBST-0,1% e posteriormente foram adicionadas 50 µL de sobrenadante de fagos, mantidos a 37 °C por uma hora. Cada placa foi lavada por cinco vezes com PBST-0,1% e posteriormente foram adicionados anticorpos secundários anti-M13 marcados com peroxidase diluído em PBS1X (1:5000), o qual foi incubado por uma hora a 37 °C.

Foram realizadas mais cinco lavagens e a reação foi revelada com OPD (SigmaFast™ OPD) e absorbância a 495 nm foi mensurada em leitor espectrofotômetro de microplacas. Os clones mais reativos no ensaio anterior foram submetidos a uma análise semelhante, comparando a reatividade destes frente a cepas de bactérias Gram-negativas (*Enterobacter sp*,

Pseudomonas aeruginosa, *Proteus mirabilis*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Providencia stuartii*, *Klebsiella pneumoniae* e *Salmonella sp*) e Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus hominis*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus porcinos*, *Enterococcus cloacae* e *Enterococcus faecalis*).

6.9. Análise *in silico* dos peptídeos obtidos no Biopanning

A metodologia utilizada para a análise *in silico* dos peptídeos oriundos do terceiro ciclo do *biopanning* com maior reatividade ELISA, foi baseada na seleção de moléculas alvos por meio do *BlastP* do NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), *Protein Data Bank* (PDB) e *pepsurf* (source:<http://pepitope.tau.ac.il>) em uma análise qualitativa das suas funcionalidades e análise qualitativa do alinhamento tridimensional dos peptídeos contra os alvos selecionados. O *BlastP* foi selecionado por permitir alinhamento entre proteínas. A base de dado selecionada foi a *RefSeq* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). O aplicativo Web do *BlastP* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) automaticamente alterou alguns parâmetros, como por exemplo, ajuste automático para algumas sequências de entrada. As anotações dos 10 primeiros alvos com melhor *score* e identidade foram analisadas para avaliar quais apresentavam algum tipo de relação com algumas bactérias envolvidas em toxicó-infecções alimentares e infecções nosocomiais. Os alvos escolhidos foram os com maior nível de indentidade, *score*, E-value mais proximo de zero.

7. Analise estatística

A análise estatística por teste de Bonferroni da reatividade dos bacteriófagos frente a bactérias Gram-negativas (*Enterobacter sp*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Providencia stuartii*, *Klebsiella pneumoniae* e *Salmonella sp*) e Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus hominis*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus porcinos*, *Enterococcus cloacae* e *Enterococcus faecalis*) foram realizadas no programa *GraphPad Prism* para Windows, versão 5.00 (*GraphPad Software Inc*).

8. RESULTADOS

8.1. Seleção de peptídeos ligantes à *Staphylococcus aureus*

Os títulos de entrada dos fagos durante a seleção foram sempre maiores que os títulos de saída, pois os fagos com maior afinidade por *Staphylococcus aureus* ficam ligados a estas por interação peptídeo e bactéria e o restante dos fagos com baixa ou sem nenhuma afinidade foram removidos durante as lavagens (Tabela 2).

Tabela 2- Seleção de fagos com peptídeos ligantes à *Staphylococcus aureus*. Título obtido (pfu) no processo de seleção.

Ciclos de seleção	Entrada (UFC/mL)	Saída (UFC/mL)
1º Ciclo	$2,0 \times 10^{11}$	$3,0 \times 10^3$
2º Ciclo	$9,9 \times 10^9$	$5,0 \times 10^2$
3º Ciclo	$1,1 \times 10^{10}$	$4,1 \times 10^2$

A qualidade da extração de DNA foi verificada por meio da eletroforese em gel de agarose 0,8% (v/v). As quantidades estimadas de DNA extraídos foram próximas da quantidade do DNA padrão, ou 400ng (Figura 6).

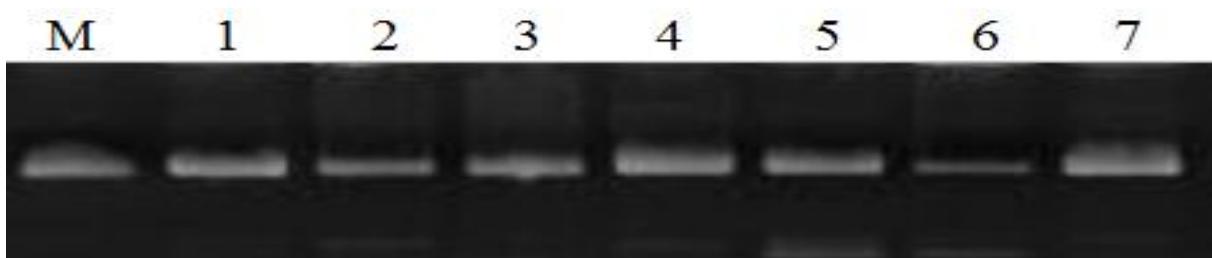


Figura 6 - Eletroforese em gel de agarose 0,8% (v/v) impregnado com brometo de etídio (concentração do brometo) contendo DNA fágico extraído após os ciclos de *Biopanning*. M: DNA de fago M13 padrão com 400 ng de DNA (*Pharmacia*). 1-7: Amostras de DNA de fago M13 distribuídas randomicamente no *biopanning*.

Confirmada a qualidade do DNA foram selecionados 40 clones para sequenciamento. Após a análise das sequências deduzidas pelo software BIOEDIT versão 7.0.9 (HALL, 1999) (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/page2.html>) foi verificado que oito sequências foram válidas, pois continham sete aminoácidos, das quais cinco foram distintas (Tabela 3).

Tabela 3- Sequências encontradas a partir dos clones selecionados no *Biopanning* e suas respectivas freqüências.

Clones	Sequência peptídica	Frequência
E05	SRHAAPI	1/8
E06	PPSNHLL	4/8
G04	PLYHTPY	1/8
G09	ASPAPIK	1/8
H02	PLPLTYL	1/8

8.2. Ensaio Imunoenzimático (ELISA)

Os peptídeos E05, E06, G04, G09 e H02 foram submetidos a um ensaio ELISA, para determinação da reatividade frente às linhagens de bactérias Gram-negativas (*Enterobacter sp*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Providencia stuartii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella sp* e *Enterobacter cloacae*) e Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus hominis*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus porcinus* e *Enterococcus faecalis*). O clone E06 apresentou os maiores valores de reatividade para a bactéria *S. aureus*. Além disto, o clone apresentou alta reatividade para as bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus* e *Staphylococcus hominis* (Figura 07).

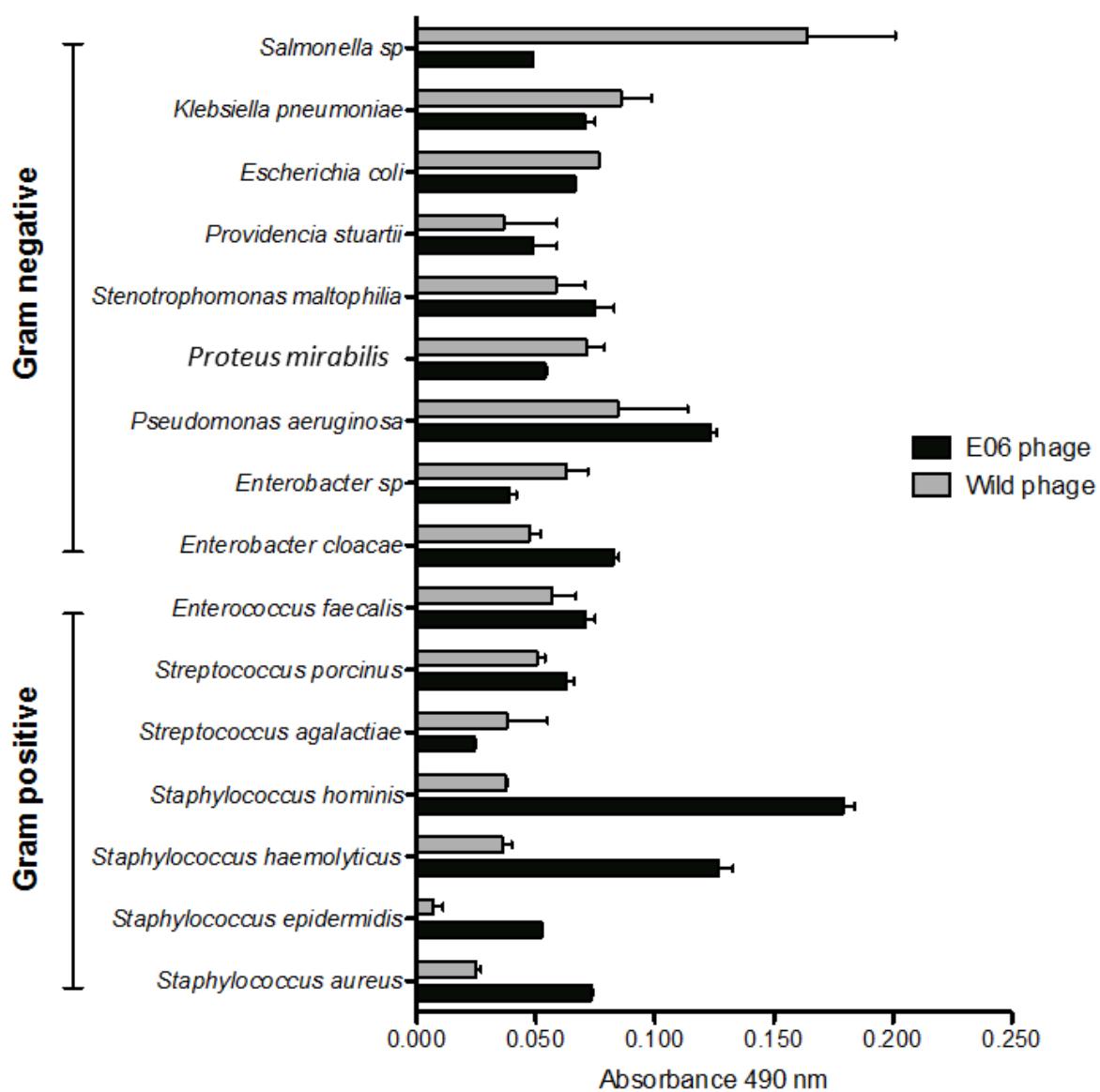


Figura 7 - Ensaio Imunoenzimático (ELISA) de reatividade do clone E06 frente às cepas de bactérias Gram-negativas e Positivas.

8.3. Análise estatística da reatividade do peptídeo E06

O clone E06 apresentou reatividade à bactérias Gram-negativas e à outras duas espécies de Gram-positivas (Figura 7), mas esta reatividade não apresentou diferenças significativas quando foi comparada ao fago selvagem (controle negativo, $p>0,05$). A maior reatividade foi observada frente à bactéria *Staphylococcus hominis*, mas não houve diferenças significativas entre esta reatividade e a observada com as outras espécies de *Staphylococcus* coagulase-negativos (*Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus haemolyticus*).

8.4. Análise *in silico* dos peptídeos selecionados

Dentre os peptídeos E05, E06, G04, G09 e H02 analisados *in silico*, observou-se que os peptídeos E05 e G09 possuíram score maior de alinhamento no *BlastP* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) com proteínas da base de dados *RefSeq* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). A tabela 4 apresenta a posição das proteínas listadas pelo o *BlastP*, com os respectivos os *scores* máximos e totais e com os valores do E-Value. Cabe ressaltar que em consultas usuais no *Blast* o valor do E-Value desejado é próximo de zero.

Tabela 4- Alinhamentos de maior identidade para o peptídeo E01, E05 e G09 - Banco de Dados “Reference Proteins” (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Clones	Descrição	Score Máximo	Score total	E-value	Identidade Máxima
E05	Proteina Sars de <i>Staphylococcus aureus</i>	17.2	33.5	0,079	100%
G09	Suposta 5'-nucleotidase de <i>Staphylococcus aureus</i> em complexo com alfa-cetoglutarato	15.9	15.9	0,14	100%

A figura 9A, se trata da proteína Sars de *Staphylococcus aureus*, que possui a função de ativar a fatores de virulência como a proteína Staphylococcal A (SpA) (1P4X_1336583116).

A figura 9B, apresenta uma provável 5'-nucleotidase de *Staphylococcus aureus* em complexo com alfa-cetoglutarato. 5'nucleotidades clivam fosfato da extremidade 5' do açucar de Uridina Pirofosfato e são principalmente envolvidas na captura de nucleotídeos pré-formados e em cascata de transdução de sinal envolvendo receptores purinérgicos (3QFK_1336578660).

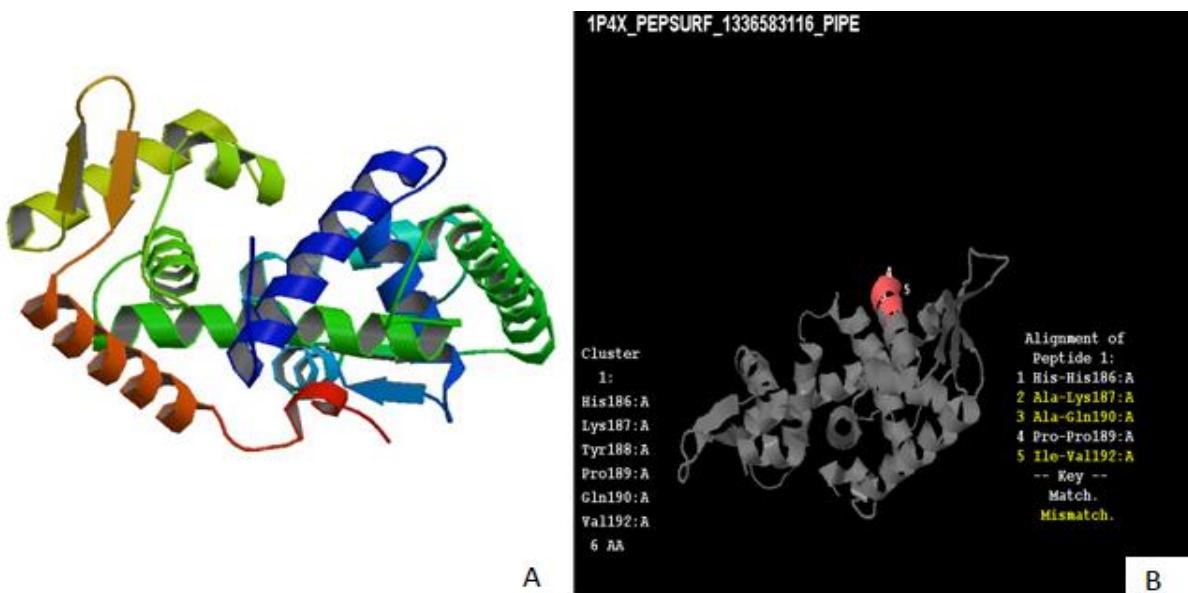


Figura9A - Alinhamento tridimensional do clone E05 com Proteina Sars de *Staphylococcus aureus*. A imagem da estrutura da proteína é apresentada em A (fonte: <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>) e o alinhamento em B (fonte: <http://pepitope.tau.ac.il/>). A região de alinhamento com o peptídeo recombinante é marcada em rosa.

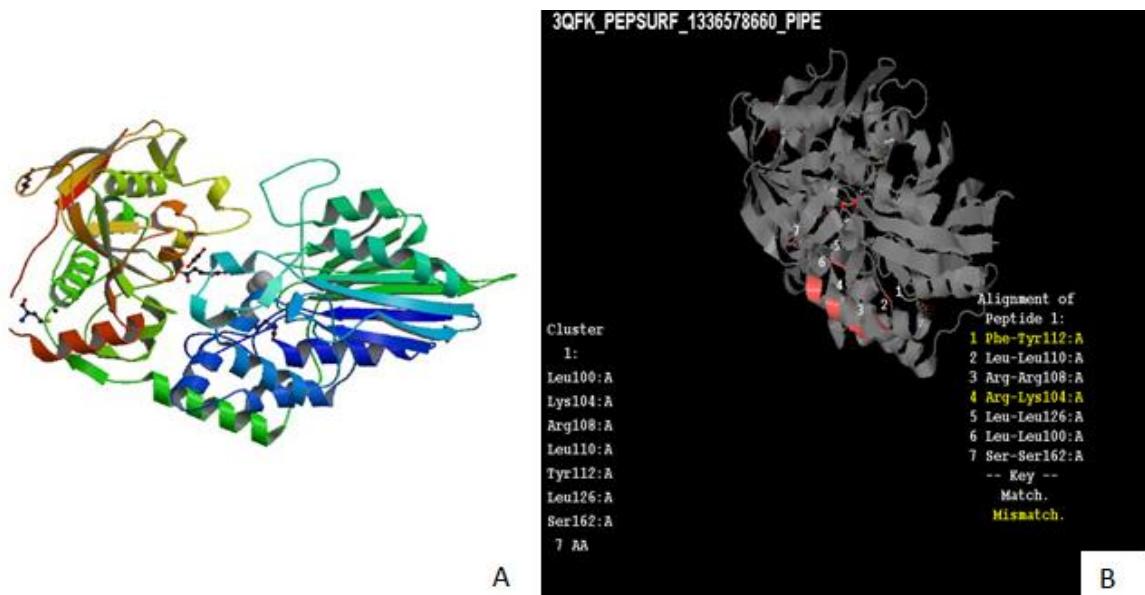


Figura 9B - Alinhamento tridimensional do clone G09 com Fator Suposta 5'-nucleotidase de *Staphylococcus aureus* em complexo com alfa-cetoglutarato. A imagem da estrutura da proteína é apresentada em A (fonte: <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>) e o alinhamento em B (fonte: <http://pepitope.tau.ac.il/>). A região de alinhamento com o peptídeo recombinante é marcada em rosa.

9. DISCUSSÃO

A metodologia de *Phage Display* é uma técnica usada para o desenvolvimento de vacinas e plataformas de diagnósticos (SMITH; PETRENKO, 1997). Neste estudo, utilizou-se a tecnologia *Phage Display* para obtenção de peptídeos ligantes a moléculas de superfície celular de *Staphylococcus aureus* que pudessem ser utilizados no desenvolvimento de métodos moleculares para detecção, caracterização e triagem de bactérias em alimentos contaminados. Particularmente esse método apresenta relevância para indústria alimentar, pois algumas linhagens de *S.aureus* apresentam a habilidade de produzir enterotoxinas termoestáveis que desencadeiam intoxicações alimentares graves (DINGES *et al.*, 2000).

Vários estudos vêm buscando o desenvolvimento de métodos eficazes para detecção de bactérias em produtos alimentares. Em um estudo foi investigado o uso de Reação em cadeia de Polimerase Multiplex (Multiplex PCR), para detecção simultânea de *Salmonella sp*, *E. coli* O157 e *Listeria monocystogenes* em amostras de carne. Neste estudo, foi demonstrado que ao se combinar o uso da técnica Multiplex PCR em conjunto com o uso de meio seletivo enriquecido para *Salmonella sp*, *E.coli* e *Listeria monocystogenes* (SEL), foi possível a detecção simultânea dos três micro-organismos em amostras de carne contaminadas artificialmente com uma sensibilidade de detecção de 10^8 UFC/10g de carne (KAWASAKI *et al.*, 2005).

Outro estudo preocupou-se em avaliar a detecção simultânea de patógenos alimentares como *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Enterobacter sakazakii*, *Escherichia coli* O157:H7, *Vibrio parahaemolyticus*, *Salmonella sp* e *Pseudomonas fluorescens* em amostras de leite e amostras de origem animal (CHIANG *et al.*, 2012). A combinação de Multiplex PCR, seguida de reação de DNA microrray cromogênica para inspeção de amostras de leite e homogenato contendo 10^0 celulas alvos por mililitro ou grama de amostra, demonstrou que todas essas espécies bacterianas podem ser detectadas em 8 horas com passos de pré enriquecimento do meio de cultura (CHIANG *et al.*, 2012).

Além do uso de Multiplex PCR e DNA microrray como descrito acima, outros métodos alternativos propostos para o diagnóstico de contaminação alimentar bacteriana têm sido desenvolvidos como, por exemplo, o uso de espectrometria de massa, imunoprecipitação de toxina bacteriana em fase solida e técnica de deslizamento de aptamôeros de RNA imobilizados (SHOME *et al.*, 2011; POCCSFALVI; SCHLOSSER, 2012; PRINCIPATO *et al.*, 2010; MAENG *et al.*, 2012). Estes métodos são mais rápidos do que o cultivo e identificação

bioquímica bacteriana tradicional, mais ainda exigem tempo e possuem custos elevados. Por isso, neste estudo foi proposta a utilização de peptídeos para construção de uma nova ferramenta para detecção rápida e a de baixo custo de bactérias Gram-positivas por meio da metodologia de PhD.

Com o intuito de selecionar peptídeos não ligantes a pools de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e utilizar os peptídeos não ligantes aos *pools* bacterianos testados para selecionar fagos ligantes à *S. aureus*, foi utilizada uma biblioteca comercial de peptídeos expressos em fagos M-13.

Selecionou-se 40 clones em três ciclos de *biopanning* frente às linhagens de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. Após o sequenciamento de DNA dos clones selecionados, foram encontrados oito clones com sequências validas (abrigando resíduos de sete aminoácidos) (Tabela 2).

Entre os peptídeos selecionados no *biopanning*, E05, E06, G04, G09 e H02 foram submetidos a ensaios de reatividade. A análise dos resultados demonstrou que nenhum peptídeo apresentou uma reação específica a *S.aureus*. No entanto, o clone E06 apresentou valores de reatividade diferencialmente significativos para as bactérias do gênero *Staphylococcus* testadas. (Figura 7). A maior reatividade foi observada frente à Coagulase Negativa *S. hominis* (Figura 7).

A detecção de espécies *Staphylococcus* Coagulase Negativas em amostras clínicas é importante devido ao seu envolvimento em doenças humanas e de animais (KLOOS; BANNERMAN, 1994). Estas amostras apresentam frequentemente altos níveis de resistência à antibióticos (YORK et al., 1996). A identificação destas espécies não é fácil devido aos traços bioquímicos similares. Atualmente, kits comerciais de identificação de staphylococci não incluem todas as espécies do gênero, focam principalmente nos sorotipos de *S. aureus* e sua confiabilidade na identificação de certas espécies não é suficiente (KAWAMURA et al., 1998).

A reatividade do clone E06 observada frente a todas as espécies de *Staphylococcus* testadas neste trabalho deve-se provavelmente à presença de componentes da parede celular que são compartilhadas entre *S. aureus* e as Coagulase Negativas. Análises de Genômica Comparativa demonstraram que a genes homólogos da lipoproteína da parede celular (gene *lpl*) são encontrados *S. aureus*, *S. haemolyticus* e *S. epidermidis*. (SUZUKI et al., 2012). Além disto, um estudo filogenético recente (LAMERS et al., 2012), demonstrou que *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* e *S. hominis* formam um *cluster* genético dentro do gênero *Staphylococcus* que é caracterizado pela inclusão dos táxons de maior significado clínico. A

proximidade genética entre estas espécies podem ser atribuídas a similaridades estruturais presentes na parede celular dos estafilococos que permitiram a ligação do peptídeo E06 à parede celular de todas as linhagens de *Staphylococcus* testadas. A alta reatividade observada frente à *S. hominis* deve-se, provavelmente, à alta freqüência da estrutura antigênica nesta parede celular. Estudos posteriores devem ser realizados para verificar esta hipótese.

Apesar de *S. aureus* ser considerado o patógeno associado às infecções nosocomiais e às intoxicações alimentares estafilococcais de maior importância, linhagens Coagulase Negativa também são frequentemente associadas à estas moléstias. Um estudo realizado por VASCONCELOS *et al.* (2011) mostrou a produção de toxinas por *S. aureus* e as espécies Coagulase Negativas utilizadas no presente trabalho. A maioria das espécies de Coagulase Negativas produtoras de toxinas foram isoladas de amostras de sangue, um dado que demonstra a importância destas linhagens como patógenos nosocomiais. Genes de enterotoxinas também foram detectados em espécies de *Staphylococcus* Coagulase Negativo isoladas de leite de cabra (LYRA *et al.*, 2013) evidenciando a importância destas linhagens como causadoras de intoxicação alimentar. Além disto, surtos de intoxicação alimentar causados por linhagens enterotoxigênicas de *Staphylococcus* Coagulase Negativos presentes em Queijo Minas Frescal e leite cru foi relatada por CARMO *et al.* (2002).

A maioria das espécies de *Staphylococcus* Coagulase Negativas são componentes da microbiota normal da pele e mucosas de humanos (KLOOS; SCHELEIFER, 1975; GRICE; SEGRE, 2011). Além do risco de envenenamento que podem oferecer, a presença destas linhagens podem indicar falhas ou ausência de Boas Práticas de Fabricação de Alimentos. Assim, métodos de detecção de estafilococos constituem uma ferramenta ideal para garantir a segurança alimentar.

Embora o clone E06 também tenha apresentado uma elevada reatividade com bactérias Gram-negativas, próxima à apresentada pelo fago selvagem, é provável que esta reatividade observada, ocorreu devido à ligação das demais proteínas da partícula de fago (pVI, pVII, pVIII, pIX) a superfície da bactéria e não devido à interação da proteína de superfície do fago recombinante (pIII) a superfície bacteriana. Este tipo de interação pode ter ocorrido por causa dos pilus F que são estruturas de conjugação bacteriana presentes nos micro-organismos Gram-negativos (WANG *et al.*, 2009).

A tecnologia de PhD utilizada neste estudo baseia-se no uso de um vetor de clonagem fago M13 simples, modificado para exibição de peptídeos fusionados aos resíduos de aminoácidos N-terminal das proteínas pIII. Estas proteínas recombinantes de fusão em fagos selvagens, e em todas as partículas (selvagens e recombinantes) modulam a infecção do fago e

entrada de DNA viral por ligação ao pilus F de receptor celular bacteriano (PARMLEY; SMITH, 1988; SCOTT; SMITH, 1990; CWIRLA *et al*, 1990; DEVLIN *et al*, 1990;. RUSSEL *et al*, 1997;. WILSON; FINLAY, 1998; RODI; MAKOWVISKI, 1999).

Ferramentas de bioinformática *BlastP* do NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), *Protein Data Bank* (PDB) e *pepsurf* ([source:<http://pepitope.tau.ac.il>](http://pepitope.tau.ac.il)) foram utilizadas para uma análise qualitativa das funcionalidades e alinhamentos tridimensionais dos peptídeos E05 e E09 contra proteínas de *Staphylococcus aureus* (Tabela 5 e Figura 8A e B). Os alinhamentos lineares destas proteínas com sequências peptídicas, permitiram a identificação de motivos protéicos comuns a estas proteínas, que podem ser alvos potenciais a drogas, desenvolvimento de vacinas, seleção de novos anticorpos, construção de biomarcadores a partir da varredura de superfície de células (BROWN, 2000).

O clone E05 alinhou-se com a proteína SarS de *Staphylococcus aureus*. A proteína SarS faz parte de uma família de proteína reguladora SarA , é constituídas por 250 resíduos de aminoácidos, se liga ao DNA e ativa um gene de transcrição de proteína de *Staphylococcus A* (*spa*) (CHEUNG *et al.*, 2008). Esta proteína não tem envolvimento em casos de contaminação alimentar, no entanto está envolvida na regulação da expressão de fatores de virulência que são responsáveis pela patogenia causada por *Staphylococcus aureus* após contaminações alimentares ou infecções hospitalares. A identificação desta proteína, com um peptídeo que se liga especificamente a ela, pode servir como uma ferramenta adicional para detecção de *Staphylococcus aureus*, tanto em pessoas vitimas de contaminações alimentares, até as com infecções nosocômias.

O peptídeo do clone G09 apresenta região de alinhamento com sequência da 5'-nucleotidase de *Staphylococcus aureus* em complexo com alfa-cetoglutarato. 5' nucleotidas clivam fosfato da extremidade 5' do açucar de Uridina Pirofosfato e são principalmente envolvidas na captura de nucleotídeos pré-formados e em cascata de transdução de sinal envolvendo receptores purinérgicos. O alimanamento a esta nucleotidase é uma evidencia que o peptídeo provavelmente pode servir como uma sequência para detecção de *Staphylococcus*.

Como a biblioteca utilizada em PhD apresenta uma variedade considerável de peptídeos chegando à ordem de bilhões de sequências aleatórias, a obtenção de sequências consenso que indiquem redução da variabilidade e a identificação no alinhamento com proteínas depositadas em bancos de dados específicos de proteínas de *Staphylococcus aureus*, é um indicador do que o processo de seleção de peptídeos ligantes a *Staphylococcus* e bactérias Gram-positivas

parece ter sido eficaz (RODI *et al.*, 2002). Estes peptídeos, como por exemplo, o peptídeo E06, pode ser utilizado para construção de uma nova ferramenta para detecção rápida de bactérias Gram-positivas envolvidas em contaminações alimentares. Nas contaminações de alimentos, triagem rápida e métodos de identificação que permitem estabelecer decisões sobre a comercialização e distribuição podem prevenir um surto de intoxicação e garantir a segurança alimentar.

Embora os peptídeos alinhados com sequências de proteínas de *Staphylococcus aureus* não tenham apresentado nenhuma relação com contaminações alimentares, podem ser utilizados para identificação bacteriana por meio da ligação às proteínas de *Staphylococcus*. Além disso, esses peptídeos podem ser usados posteriormente como biomarcadores para detecção de alvo potencial para desenvolvimento drogas mais eficiente contra *Staphylococcus*.

10. CONCLUSÕES

1. Foram selecionados peptídeos com capacidade de ligação específica à bactérias pertencentes ao gênero *Staphylococcus*, ainda que não tenham sido selecionados peptídeos ligantes específicos a *S.aureus*.

2. Foi possível selecionar peptídeos que podem ser utilizados na construção de uma nova ferramenta para detecção rápida bactérias pertencentes ao gênero *Staphylococcus*;

3. As análises *in silico* dos peptídeos revelaram que podem compartilhar características químicas a proteínas das células de *Staphylococcus aureus*, ainda que as validações experimentais por meio de ensaios imunoenzimáticos, tenham mostrado que os peptídeos selecionados, não eram ligantes apenas de *S.aureus* mas também das demais bactérias Gram-positivas testadas.

11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AZZAY, H.M.E; HIGHSMITH, W.E. Phage display technology: clinical applications and recent inovations. **Clinical Biochemistry**, Toronto, v. 35, p. 425-445, 2002.
- BABA, T., KURODA, M., YUZAWA, H., OGUCHI, A., NAGAI, Y., IWANA, N., ASANO, K., NAIMI, T., KURODA, H., CUI, L., YAMAMOTO, K., HIRAMATSU, K. Genome and virulence determinants of highvirulence community-acquired MRSA. **Lancet**, v. 359, p. 1819–1827. 2002.
- BAIRD-PARKER, A.C. The Staphylococci: an introduction. **J. of Appl. Bacteriol.Symposium Suplement**, p. 1-8. 1990.
- BALABAN, N; RASOOLY, A. Staphylococcal Enterotoxins. **Int. J. Food Microbiol**, v. 61, p. 1–10. 2000.
- BANIA, J.; DABROWSKA, A.; BYSTRON, J.; KORZEKWA, K.; CHRZANOWSKA, J.; MOLENDÀ, J. Distribution of newly described enterotoxin-like genes *Staphylococcus aureus* from food. **International Journal of food Microbiology**, Amsterdam, v. 108, n. 1, p. 36-41. 2006.
- BANNERMAN, T.L. *Staphylococcus, Micrococcus*, and other catalase-positive cocci grow aerobically. **Manual of clinical microbiology**. p.384-404, 2003.
- BARBAS, C.F.III.; BURTON, D.R.; SILVERMAN, G.J. **Phage Display: A Laboratory Manual**. Plain View, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- BENHAR, I. Biotechnological applications of phage and cell display. **Biotechnol Adv**, v.19, n.1, p. 1-33. 2001.
- BENNETT, R.W; MONDAY, S.R. *Staphylococcus aureus*. In: MILIOTIS, M.D; (Eds). International Handbook of Foodborne Pathogens. New York: Marcel Dekker, Inc., cap. 4, p. 41-59, 2003.
- BERGDOLL, M.S.; CRASS, B.A.; REISER, R.F.; ROBBINS, R.N.; DAVIS, J.P. A New Staphylococcal Enterotoxin, Enterotoxin F, Associated with Toxic-Shock-Syndrome *Staphylococcus Aureus* Isolates. **Lancet**, p. 1017-21. 1981.
- BHAKDI, S; TRANUM-JENSEN, J. Alpha-toxin of *Staphylococcus aureus*. **Microbiol. Rev**, v. 55, p.733–751. 1991.
- BOACH, G.A; FOSTER, T.J. *S.aureus* exotoxins. **American Society Microbiology**, p. 367-378, 2000.
- BOLETIM ELETRÔNICO EPIDEMIOLÓGICO. Vigilância epidemiológica das doenças transmitidas por alimentos no Brasil. Brasília, 1999 – 2009. Disponível em www.saude.gov.br.svs. Acesso em 05 de Fevereiro de 2013.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n. 216, de 15 de setembro de 2004. Estabelece procedimentos de boas práticas para serviços de alimentação a

fim de garantir as condições higiênico-sanitárias do alimento preparado. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 17 set. 2004.

BRASIL. Manual integrado de prevenção e controle de doenças transmitidas por alimentos. Brasília, 2006. 136p. <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_dta.pdf>.

BRATKOVIC, T. Progress in phage display: evolution of the technique and its applications. **Cell Mol Life Sci**, v. 67, p. 749-767, 2010.

BROWN, K.C. New approaches for cell-specific targeting: identification of cell-selective peptides from combinatorial libraries. **Curr Opin Chem Biol**, v.4, n.1, p. 16-21, 2000.

BUONPANE, R.A.; CHURCHILL, H.R.; MOZA, B.; SUNDBERG, E.J.; PETERSON, M.L.; SCHLIEVERT, P.M.; KRANZ, D.M. Neutralization of staphylococcal enterotoxin B by soluble, high-affinity receptor antagonists. **Nat Med**, p. 725-729, 2007.

CARDOSO, H.F.T.; CARMO, L.S.; SILVA, N. Detecção da toxina-1 da síndrome do choque tóxico em amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de mastite bovina. Arq. Bras. **Med.Vet. Zootec**, v. 52, n. 1, p. 7-10, 2000.

CARMO, L. S.; DIAS, R. S.; LINARDI, V. R. et al. Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in Minas cheese and raw milk in Brazil. **Food Microbiol.** **2002**, 19, 9–14.

CHEN, T.R.; HSIAO, M.H.; CHIOU, C.S.; TSEN, H.Y. Development and use of PCR primers for the investigation of C1, C2, and C3 enterotoxin types of *Staphylococcus aureus* strains isolated from food-borne outbreaks. **International Journal of Food Microbiology**, v. 71, p. 63-70. 2001.

CHEN, Y.; KORIPELLA, R.K.; SANYAL, S.; SELMER, M. Staphylococcus aureus elongation factor G – structure and analysis of a target for fusidic acid. **FEBS Journal**, v. 227, n. 18, p. 3789-803, 2010.

CHEUNG, L.A.; NISHINA, K.A.; POUS, M.P.T.; TAMBER, S. The SarA protein family of *Staphylococcus aureus*. **Int J Biochem Cell Bio**, v. 40, n. 3, p. 355-61, 2008.

CHIANG, I. C.; LIAO, W.W.; FAN, C.M.; PAI, W.Y.; CHIOU, C.S.; TSEN, H.Y. PCR detection of Staphylococcal enterotoxins (SEs) N, O, P, Q, R, U, and survey of SE types in *Staphylococcus aureus* isolate from food poisoning cases in Taiwan. **International Journal of food Microbiology**, v. 121, n. 1, p. 66-73. 2008.

CHIANG, Y.C. Multiplex PCR and a chromogenic DNA macroarray for the detection of *Listeria monocytogens*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Enterobacter sakazakii*, *Escherichia coli* O157:H7, *Vibrio parahaemolyticus*, *Salmonella* spp. and *Pseudomonas fluorescens* in milk and meat samples. **J Microbiol Methods**, v.88, n.1, p.110-6, 2012.

CORBELLA, X.; DOMÍNQUEZ, M.A.; PUJOL, M.; AYATS, J.; SENDRA, M.; PALLARES, R., ARIZA, J.; GUDIOL, F. *Staphylococcus aureus* nasal carriage as a marker for

subsequent staphylococcal infections in intensive care unit patients. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 16, p. 351-357. 1997.

CREMONESI, P.; LUZZANA, M.; BRASCA, M.; MORANDI, S.; LODI, R.; VIMERCATI, C.; AGNELLINI, D.; CARAMENTI, G.; MORONI, P.; CASTIGLIONE, B. Development of multiplex PCR assay for the identification of *Staphylococcus aureus* enterotoxigenic strains isolated from milk and dairy products. **Mol. Cell. Probes**, v. 19, p. 299-305. 2005.

CUNHA, M.L.R.S.; CALSOLARI, R.A.; JÚNIOR, J.P. Detection of enterotoxin and toxic shock syndrome toxin 1 genes in *Staphylococcus*, with emphasis on coagulase-negative staphylococci. **Microbiology and Immunology**, v. 51, n. 4, p. 381-390. 2007.

CWIRLA, S.E.; PETERS, E.A.; BARRETT, R.W.; DOWER, W.J. Peptides on phage: a vast library of peptides for identifying ligands. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v. 87, p. 6378-6382, 1990. DEVLIN, J.J., PANGANIBAN, L.C., DEVLIN, P.E. Random peptide libraries: a source of specific protein binding molecules. **Science**, v. 249, p. 404-406, . 1990.

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

DOBRINDT, U.; HOCHHUT, B.; HENTSCHEL, U.; HACKER, J. Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, p. 414-424, 2004.

EUZÉBY, J.P. List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: a folder available on the internet. **International Journal Systematic Bacterial**, v.47, p.590-592. 1997.

EVENSON, M. L.; HINDS, M.W.; BERNSTEIN, R.S.; BERGDOLL, M.S. Estimation of human dose of staphylococcal enterotoxin A from a large outbreak of staphylococcal food poisoning involving chocolate milk. **International Journal of Food Microbiology**, v. 7, p. 311-316. 1988.

FRANCO, B. D. G. M; LANDRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Ed. Atheneu, 1996. 182p.

FREITAS, M. F. L.; LEAL BALBINO, T.C.; MOTA, R.A., STAMFORD, T.L.M . Exotoxinas Estafilocócicas. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, Recife, v. 7, p. 63-74, 2004.

FUKUNAGA, K; TAKI, M. Practical Tips for Construction of Custom Peptide Libraries and Affinity Selection by Using Commercially Available Phage Display Cloning Systems. **Journal of Nucleic Acids**, Tokyo, v. 2012, p. 1-9, 2012.

GAO, Y.G.; SELMER, M.; DUNHAM, C.M.; WEIXLBAUMER, A.; KELLEY, A.C.; RAMAKRISHNAN, V. The Structure of the Ribosome with Elongation Factor G Trapped in the Posttranslocational State. **Science**, v. 326, n. 5953, p. 694-699, 2009.

GARRITY, G.M. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 2nd Edition: V. 3: The low G+C Gram positives. **Spring-Verlag, New York**. ISBN 0-387-95041-9, 2006.

GILL, S.R. et al. Insights on evolution of virulence and resistance from the complete genome analysis of an early methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain and a biofilm-producing

methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* strain. **J. Bacteriol.**, v.187, p. 2426-2438, 2005.

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

GRICE, E. A; SEGRE, J. A. The skin microbiome. *Nat. Rev. Microbiol.* **2011**, 9, 244-253.

HACKER, J; CARNIEL. E. Ecological fitness, genomic islands and bacterial pathogenicity. A Darwinian view of the evolution of microbes. **EMBO Rep.**, v. 2, p. 376–381. 2001.

HERZER, C.M. Toxic Shock syndrome: broadening the differential diagnosis. *J Am Board Fam Pract.* Mar – Apr; 14(2): 131-6, 2001.

HOLECKOVÁ, B.; HOLODA, E.; FOTTA, M.; KALINÁCOVA, V.; GONDOL' J.; GROLMUS, J. Ocurrence of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in food. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, n. 9, p. 179-182. 2002.

HUANG, I.Y.; HUGHES, J.L.; BERGDOLL, M.S.; SCHANTZ, E.J. Complete amino acid sequence of staphylococcal enterotoxin A. **Journal of Biological Chemistry**, v. 262, p. 7006-7013. 1987.

HUFTON, S.E.; MOERKERK, P.T.; MEULEMANS, E.V.; BRUÏNE, A.; ARENDTS, J.W.; HOOGENBOOM, H.R. Phage display of cDNA repertoires: the pVI display system and its applications for the selection of immunogenic ligands. **J Immunol Methods**, v. 231, p. 39–51, 1999.

HUSEBY, M. et al. Structure and biological activities of beta toxin from *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**, v.23, p. 8719-8726. 2007.

HYUY, Y.H. **Foodborne disease handbook-diseases caused by bacteria**. New York: Marcel Dekker; 1994.

ITO, T.; OKUMA, K.; MA, X.X.; YUZAWA, H.; HIRAMATSU, K. Insights on antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* from its whole genome: genomic island SCC. **Drug Resist. Update**, v.6, p. 41-52,2003.

JAY, J.M. Gastroenterite estafilocócica In: JAY, JM. **Microbiologia dos Alimentos**. 6ed., Porto Alegre: Aramed, cap. 23. 471-489, 2005.

JOHNS JR, M. B; KHAN, A. Staphylococcal enterotoxin B gene is associated with discrete genetic element. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 170, p. 4033-4039, 1988.

JONES, T.O; WIENEKE, A.A. Staphylococcal toxic shock syndrome. **Vet. Rec.**, v.119, p.435, 1986.

KATAYAMA, Y., ITO, T., HIRAMATSU, K. A new class of genetic element, staphylococcus cassette chromosome *mec*, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 44, p. 1549–1555. 2000.

KAWAMURA, Y.; HOU, X.; SULTANA, F.; HIROSE, K.; MIYAKE , M.; SHU, S.; EZAKI, T. Distribution of *Staphylococcus* Species among human clinical specimens and emended description of *Staphylococcus caprae* *J Clin Microbiol.* **1998**, 36(7), 2038–2042.

KAWASAKI, S.; HORIKOSHI, N.; OKADA, Y.; TAKESHITA, K.; SAMESHIMA, T.; KAWAMOTO, S. Multiplex PCR for simultaneous detection of *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli* O157:H7 in meat samples. **J Food Prot**, v.68, n.3, p.551-6, 2005.

KLOOS, W. E; BANNERMAN, T. L. *Staphylococcus and Micrococcus. Manual of Clinical Microbiology*. American Society for Microbiology. 7th. Edition. 1999. Cap.16, p.264-282.
KLOOS, W.E; BANNERMAN, TL. Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci. *Clin Microbiol Rev.* **1994**, 7, 117–140.

KLOOS; W.ESCHELEIFER, K.H. Isolation and characterization of Staphylococci from human skin. II. Description of four new species: *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus hominis*, and *Staphylococcus simulans*. *Inter. Journ. System. Bacteriol.* **1975**, 25, 62-79.

KLOTZ, M.; OPPER, S.; HEEG, K.; ZIMMERMANN, S. Detection of *S.aureus* enterotoxins A to D by real time-fluorescence PCR assay. *J Clin Microbiol.* v. 41, p 4683-4687, 2003.

CLUYTMANS, J.A.J.W. Methicilin resistant *Staphylococcus aureus* in food products: cause for concern or cause for complacency? **Clin. Microbial. Infect.**, v.16, n.1, p. 11-15. 2010.

KOKAN, N. P; BERGDOLL, M. S. Detection of low-enterotoxin-producing *Staphylococcus aureus* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, p. 2675-2676. 1987.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN., J.R.W.C. Diagnóstico microbiológico. 5. ed. Rio de Janeiro; MEDSI, 2001.

KURODA, M. et al. Whole genome sequencing of methicilin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Lancet**, v. 357, p. 1225-1240. 2001.

LABANDEIRA-REY, M. et al. *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin causes necrotizing pneumonia. **Science**, v. 5815, p. 1130-1133. 2007.

LAMERS, R. P.; MUTHUKRISHNAN, G.; CASTOE, T. A. et al. Phylogenetic relationship among *Staphylococcus* species and refinement of cluster groups based on multilocus data. **BMC Evolut. Biol.** **2012**, 12, 171.

LAWRENCE, J. R.; KORBER, D.R.; HOYLE, B.D.; COSTERTON, J.W.; CALDWELL, D.E. Optical sectioning of microbial biofilms. **Journal of Bacteriology**, v. 173, p. 6558-6567. 1991.

LE LOIR, Y.L.; BARON, F.; GAUTIER, M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. **Gen. Mol. Res.**, v.2, n. 1 p. 63-73. 2003.

LEE, Y.J.; YI, H.; KIM, W-J.; KANG, K.; YUN, D.S.; STRANO, M.S.; CEDER, G.; BELCHER, G. Fabricating genetically engineered high-power lithium-ion batteries using multiple virus genes. **Science**, v. 324, p. 1051–1055, 2009.

LETERTRE, C.; PERELLE, S.; DILASSER, F.; FACH, P. Identification of a new putative enterotoxin SEU encoded by the *egc* cluster of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, p. 38-43.

LINA, G.; BOHACH, G.A.; NAIR, S.P.; HIRAMATSU, K.; JOUVIN-MARCHE, E.; MARIUZZA, R. Standard nomenclature for the superantigens expressed by *Staphylococcus*. The **Journal of Infectious Diseases**, v. 189, p. 2334-2336. 2004.

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

LØSET, G. A°.; ROOS, N.; BOGEN, B.; SANDLIE, I. Expanding the Versatility of Phage Display II: Improved Affinity Selection of Folded Domains on Protein VII and IX of the Filamentous Phage. **PLoS ONE**, v. 6, n. 2, p. 1-10, 2011.

LYRA, D. G.; SOUSA, F.; BORGES, C. G. et al. Enterotoxin-Encoding Genes in *Staphylococcus* spp. from Bulk Goat Milk. **J. Food Path. and Dis.** **2013**, *10*, 126-130.

MAENG, J.S.; KIM, S., KIM, C.T.; HAN, S.R.; LEE, Y.J.; LEE, S.W.; LEE, M.H.; CHO, Y.J. Rapid detection of food pathogens using RNA aptamers-immobilized slide. **Journal Nanosci Nanotechnol.**, v. 12,n. 7, p. 5138-5142, 2012.

MALACHOWA, N; DE LEO, FR. Mobile genetic elements of *Staphylococcus aureus*. **Cell Mol Life Sci**, v. 67, p.3057–3071, 2010.

MARR, J. C.; LYON, J.D.; ROBERSON, J.R.; LUPHER, M.; DAVIS, W.C.; BOHACH, G.A. Characterization of novel type C staphylococcal enterotoxins: biological and evolutionary implications. **Infection and Immunity**, v. 61, p. 4254-4262. 1993.

MARSHALL, M.J.; BOHACH, G.A.; BOEHM, D.F. Characterization of *Staphylococcus aureus* beta-toxin induced leukotoxicity. **J. Nat. Toxins**, v.9, p. 125-138. 2000.

MCCORMICK, J.K.; YARWOOD, J.M.; SCHLIEVERT, P.M. Toxic shock syndrome and bacterial superantigens: an update. **Ann Rev Microbiol.** **55**, 77 - 104, 2001.

MEAD, P.S.; SLUTSKER, L.; DIETZ, V.; McCAG, L.F.; BRESEE, J.S.; SHAPIRO, C.; GRIFFIN, P.M.; TAUXE, R.V. Food-Related Illness and Death in the United States. **Emerging Infectious Diseases**, v. 5, n. 5, p.607-625. 1999.

MENESTRINA, G.; DALLA SERRA, M.; COMAI, M.; CORAIOLA, M.; VIERO, G.; WERNER, S.; COLIN, D.A.; MONTEIL, H.; PRÉVOST, G. Ion channels and bacterial infection: the case of beta-barrel pore-forming proteintoxins of *Staphylococcus aureus*. **FEBS Lett.**, v. 552, p. 54–60. 2003.

MOLEK, P.; STRUKELJ, B.; BRATKOVIC, T. Peptide phage display as a tool for drug discovery: targeting membrane receptors. **Molecules**. v. 16, n. 1, p. 857-887. 2011.

MORANDI, S.; BRASCA, M.; LODI, R.; CREMONESI, P.; CASTIGLIONI, B. Detection of Classical enterotoxins and indentification enterotoxins genes in *Staphylococcus aureus* from milk and dairy products. **Veterinary Microbiology**, Shannon, V. 24, n. 1-2, p. 66-72, Set., 2007.

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

O'SEAGHDHA.; VAN SCHOOTEN, C.J.; KERRIGAN, S.W.; EMSLEY, J.; SILVERMAN, G.J.; COX, D.; LENTING, P.J.; FOSTER, T.J. *Staphylococcus aureus* protein A bidding to von willebrand factor A1 domain is mediated by conserved IgG bidding regions. **FEBS J**, v. 273, n. 21, p. 4831-4841. 2006.

OMOE, K.; HU, D.L.; TAKAHASHI-OMOE, H.; NAKANE, A.; SHINAGAWA, K. Comprehensive analysis of classical and newly described Staphylococcal superantigenic toxin genes in *Staphylococcus aureus* isolates. **FEMS Microbiology Letters**, v. 246, n. 2, p. 191-198. 2005.

PAMLEY, S.F; SMITH, G.P. Antibody-selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes. **Gene**, v. 73, n. 2, p. 305–318, 1988.

PARRILO, J.E. Pathogenic Mechanism of septic shock. **N. Engl. J.M**, V.329, p. 1427.1993.

PEREIRA, M. L.; CARMO, L. S.; SANTOS, E. J.; PEREIRA, J. L.; BERGDOLL, M. S. Enterotoxin H in Staphylococcal Food Poisoning. **J. of Food Protect**, v. 59, n. 5, p. 559-561. 1996.

PINCHUK, I.V.; BESWICK, E.; REYES, V. Staphylococcal Enterotoxins. **Toxins**, v. 2, p. 2177-2197. 2010.

POCSFALVI, G; SCHLOSSER, G. Detection of bacterial protein toxins by solid phase magnetic immunocapture and mass spectrometry. **Methods Mol Biol**, v. 739, p.3-12, 2011.

PRÉVOST, G.; MOUREY, L.; COLIN, D.A.; MENESTRINA, G. Staphylococcal pore-forming toxins. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.** 257 p. 53-83, 2001.

PRINCIPATO, M.; NJOROGE, J.M.; PERLLONI, A.; O'DONNELL, M.; BOYLE, T.; JONES, R.L. Detection of target staphylococcal enterotoxin B antigen in orange juice and popular carbonated beverages using antibody-dependent antigen-capture assays. **Journal of Food Sci.**, v. 75, n. 8, p. 141-147, 2010.

RODI, D.J.; SOARES, A.S.; MAKOWSKI, L. Quantitative assessment of peptide sequence diversity in M13 combinatorial peptide phagedisplay libraries. **J Mol Bio**, v. 322, n. 5, p. 1039-1052, 2002.

RODI, D.J; MAKOWISKI, L. Phage Display technology- finding a needle in a vascular molecular haystack. **Curr. Opin. Biotechnol.** v. 10, p. 87-93, 1999.

RUSSEL, M.; LINDEROTH, N.A.; SALI, A. Filamentous phage assembly: variation on a protein export theme. **Gene**, v. 92, p. 23-32, 1997.

SCHMIDT, H; HENSEL, M. Pathogenicity Islands in Bacterial Pathogenesis. **ClinicalMicrobiology Reviews**, v. 17. n. 1, p. 14-56. 2004.

SCOTT, J.K; SMITH, G.P. Searching for peptide ligands with an epitope library. **Science**, v. 249, p. 386-390, 1990.

SEARS P. M; MCCARTHY, K. K. Management and treatment of staphylococcal mastitis. **Vet Clin Food Anim**, v.19, p. 171-185. 2003.

SHOME, B.R.; DAS MITRA, S.; BHUVANA, M.; KRITHIGA, N.; VELU, D.; SHOME, R.; ISLOOR, S.; BARBUDDHE, S.B.; RAHMAN, H. Multiplex PCR assay for species identification of bovine mastitis pathogens. **Journal of Appl Microbiol.**, v. 111, n. 6, p. 1349-56, 2011.

SIMONS, G.F.; KONINGS, R.N.; SCHOPENMAKERS, J.G. Genes VI, VII, and IX of phage M13 code for minor capsid proteins of the virion. **PNAS**, v. 78, p. 4194-4198, 1981.

SMITH, G.P. Filamentous fusion phage : novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. **Science**, V. 228, n. 47-05, p. 1315-1317. 1985.

SMITH, G.P; PETRENKO, V. A. Phage Display. **Chem. Rev**, v. 97, n. 2, p. 391-410, 1997.

SUSUKI, H.; LEFÉBURE, T.; BITAR, P. P. et al. Comparative genomic analysis of the genus *Staphylococcus* including *Staphylococcus aureus* and its newly described sister species *Staphylococcus simiae*. **BMC Genomics** [Online] 2012, 13, doi:10.1186/1471-2164-13-38.

TANAKA, Y.; MORIKAWA, K.; OHKI, Y.; YAO, M.; TSUMOTO, K.; WATANABE, N.; OHTA, T.; TANAKA, I. Structural and mutational analyses of Drp35 from *Staphylococcus aureus*: a possible mechanism for its lactonase activity. **J.Biol.Chem**, v. 282, p. 5770-5780, 2007.

TORRES, V. J.; PISHCHANY, G.; HUMAYUN, M.; SCHNEEWIND, O.; SKAAR, E.P. *Staphylococcus aureus* IsdB is a hemoglobin receptor required for heme iron utilization. **Journal of Bacteriology**, v. 24, p. 8421- 8429. 2006.

VARSHNEY, A.K.; MEDIAVILLA, J.R.; ROBIOU, N.; GUH, A.; WANG, X.; GIALANELLA, P.; LEVI, M.H.; KREISWIRTH, B.N.; FRIES, B.C. Diverse enterotoxin gene profiles among clonal complex of *Staphylococcus aureus* isolates from Bronx, New York. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.75, n. 21, p. 6839-6849. 2009.

VASCONCELOS, N. G.; PEREIRA, V. C.; ARAÚJO JÚNIOR, J. P. et al. Molecular detection of enterotoxins E, G, H and I in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci isolated from clinical samples of newborns in Brazil. *J. Appl. Microbiol.* **2011**, *111*, 749-762.

WALEV, I.; WELLER, U.; STRAUCH, S.; FOSTER, T.; BHAKDI, S. Selective Killing of human monocytes and cytokine release provoked by sphingomyelinase (β -toxin) of *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun.*, v. 64, p. 2974-2979. 1996.

WANG, Y.A.; YU, X.; SILVERMAN, P.M., HARRIS, R.L.; EGELMAN, E.H. The structure of F-pili. *Journal of molecular biology*, v. 385, n. 1, p. 22-29, 2009.

WATANABE, T.; WATANABE, M.; ISHII, Y.; MATSUBA, H.; KIMURA, S.; FUJITA, T., KOMINAMI, E.; KATUNUMA, N.; UCHIYAMA, Y. An Immunocytochemical Study on Co-Localization of Cathepsin B and Atrial Natriuretic Peptides in Secretory Granules of Atrial Myoendocrine Cells of Rat Heart. *J. Histochem. Cytochem.*, v. 37, p. 347–351. 1989.

WERTHEIM, H.F.; MELLES, D.C.; VOS, M.C.; VAN LEEUWEN, W.; VAN BELKUM, A.; VERBRUGH, H.A.; NOUWEN, J.L. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infect. Dis.*, v. 5, p. 751–762. 2005.

WILSON, D.R; FINLAY, B.B. Phage display: applications, innovations, and issues in phage and host biology. *Can. J. Microbiol.* V. 44, 1998.

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

YORK, M.K.; GIBBS, L.; CHEHAB, F.; BROOKS, G.F. Comparison of PCR detection of *mecA* with standard susceptibility testing methods to determine methicillin resistance in coagulase-negative staphylococci. *J Clin Microbiol.* **1996**, *34*, 249–253.