



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E FISILOGIA ANIMAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL

Caracterização molecular de *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos isolados do molusco bivalve *Anomalocardia brasiliiana* (GMELIN, 1791)

JACQUELINE ELLEN CAMELO BATISTA

Recife, PE

2013

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E FISIOLOGIA ANIMAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL

Caracterização molecular de *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos isolados do molusco bivalve *Anomalocardia brasiliiana* (GMELIN, 1791)

JACQUELINE ELLEN CAMELO BATISTA

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal Tropical.

Orientador: Prof. Dr. José Vitor Moreira Lima Filho.

Co-orientador (a): Dra. Nilma Cintra Leal.

Recife, PE

2013

Ficha Catalográfica

B333c Batista, Jacqueline Ellen Camelo
 Caracterização molecular de *Staphylococcus* spp.
 coagulase – negativos isolados do molusco bivalve
 Anomalocardia brasiliiana (GMELIN, 1791) / Jacqueline Ellen
Camelo Batista. –
 Recife, 2013.
 70 f.: il.

 Orientador (a): José Vitor Moreira Lima Filho.
 Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciência
Animal Tropical) – Universidade Federal Rural de
Pernambuco, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal,
Recife, 2013.

 Inclui referências e apêndice.

 1. *Staphylococcus* 2. Enterotoxinas 3. *mecA*
4. *Anomalocardia brasiliiana* 5. Cefoxitina I. Lima Filho, José
Vitor Moreira, Orientador II. Título

CDD 591.4

Dedico este trabalho aos meus pais, Luzia Camelo e Eúde Batista, ao meu irmão Glauber Henrique e, também ao meu noivo Antonio Ricardo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que colaboraram para a realização desta dissertação, em especial:

À Universidade Federal Rural de Pernambuco pela formação profissional.

À José Vitor, pela orientação durante todos esses anos de pesquisa acadêmica, atenção, confiança, além da sua contribuição essencial para o meu desenvolvimento profissional e também pessoal. Sou muito grata por tudo, Obrigada.

À Dra Nilma, por ter me proporcionado o embasamento teórico na área da microbiologia molecular, dedicação e incentivo. A sua co-orientação foi fundamental para a realização deste trabalho.

Ao curso de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical, bem como seu corpo docente, funcionários e colegas que contribuíram para a concretização deste projeto. Em especial, à Prof (a). Marleyne Amorim pelo carinho e por ter sido sempre solícita.

À todos do laboratório de Microbiologia e Imunologia (LAMIM), em especial à Danielle Cristina e Renata Vaz pela ajuda nos experimentos, conselhos e apoio indispensáveis. À Taciana Ralph e aos estagiários da graduação Nelito Jorge e Daiane Laise que me ajudaram na execução do trabalho.

Aos integrantes do grupo de pesquisa da área de microbiologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (FIOCRUZ-PE), em especial, à Ewerton Lucena que me ensinou as técnicas moleculares com muita paciência. À Wagner Oliveira, Eduarda Manguiera, Niedja e Livia pelo apoio durante a pesquisa.

À Mariana Andrade e Carol Luz pela ajuda na padronização de algumas técnicas moleculares desta dissertação.

Às companheiras da pós-graduação, Fernanda Lino e Cecília Oliveira, pelo apoio imprescindível neste período.

À Plataforma Tecnológica do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães pela ajuda no sequenciamento das amostras.

FONTES FINANCIADORAS

A presente pesquisa teve o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) no financiamento da bolsa de mestrado e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) no financiamento do projeto.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1	Recursos Pesqueiros e Pesca Artesanal.....	14
2.2	Molusco bivalve <i>Anomalocardia brasiliana</i>	15
2.3	Contaminação microbiológica dos moluscos bivalves.....	17
2.4	Gênero <i>Staphylococcus</i>	18
2.4.1	Estafilococos coagulase positivo.....	19
2.4.2	Estafilococos coagulase negativo.....	20
2.5	Intoxicação alimentar por estafilococos.....	20
2.5.1	Enterotoxinas estafilocócicas.....	22
2.6	Resistência aos antimicrobianos no gênero <i>Staphylococcus</i>	23
3	OBJETIVOS	26
3.1	Objetivo geral.....	26
3.2	Objetivos específicos.....	26
4	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27
5	MANUSCRITO - Caracterização fenotípica e genotípica de <i>Staphylococcus</i> coagulase-negativos resistentes à meticilina isolados do molusco bivalve <i>Anomalocardia brasiliana</i> (GMELIN, 1791)	42
	Resumo.....	43
	Introdução.....	44
	Material e Métodos.....	45
	Resultados.....	49
	Discussão.....	50
	Conclusão.....	52
	Agradecimentos.....	52
	Referências.....	53
6	CONCLUSÃO	68
7	APÊNDICE	69

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Produção de pescado no Brasil (t) em 2009 e 2010 determinada por região.....14
- Figura 2** - Etapas de processamento do molusco *A. brasiliiana* na praia de Mangue Seco, Igarassu.....17
- Figura 3** - Localização da área de estudo na Praia de Mangue Seco\Igarassu-PE.....46
- Figura 4** – Gel representativo dos produtos de amplificação da PCR dos genes *mecA*, *seg* e *seh* em *Staphylococcus* coagulase-negativos.....67
- Figura 5** – Gel representativo dos produtos de amplificação da PCR do gene *mecA* em *Staphylococcus* coagulase-negativos.....69
- Figura 6** - Gel representativo dos produtos de amplificação da PCR do gene *seh* em *Staphylococcus* coagulase-negativos.....69
- Figura 7** - Gel representativo dos produtos de amplificação da PCR do gene *seg* em *Staphylococcus* coagulase-negativos.....70

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Perfis de suscetibilidade aos antimicrobianos de *Staphylococcus* spp. isolados de amostras ambientais de *A. brasiliana*..... 60
- Tabela 2** - Perfis de suscetibilidade aos antimicrobianos de *Staphylococcus* spp. isolados de amostras comercializadas de *A. brasiliana*.....62
- Tabela 3** - Caracterização fenotípica e genotípica das espécies de estafilococos resistentes à meticilina (MRS) isoladas de amostras ambientais do molusco *A. brasiliana*.....64
- Tabela 4** - Caracterização fenotípica e genotípica das espécies de estafilococos resistentes à meticilina (MRS) isoladas de amostras comercializadas do molusco *A. brasiliana*.....65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

attB _{scc}	Sítio de ligação ao cromossoma bacteriano
CA-MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistentes à meticilina adquiridos na comunidade.
ccr	Cassete Cromossômico Recombinase
DTA	Doenças Transmitidas por Alimentos
ECN	Estafilococos coagulase negativo
egc	Grupo gênico de enterotoxinas
ET	Enterotoxinas
FAO	Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação
FDA	Administração de Alimentos e Medicamentos
FRI	Instituto de Pesquisas em Alimentos
MHC II	Complexo de histocompatibilidade de classe II
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistentes à meticilina
NNIS	Sistema Nacional de Vigilância de Infecções Nosocomiais
PBP	Proteína Ligadora de Penicilina
RIISPOA	Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal.
SAPI	Ilhas de patogenicidade
SCC _{mec}	Cassete cromossômico estafilocócico mec
SEA-SEE	Enterotoxinas estafilocócicas A,B, C, D e E
SEG-SEI	Enterotoxinas estafilocócicas G, H e I
SER-SET	Enterotoxinas estafilocócicas R, S e T
SEIJ-SEIQ	Enterotoxinas like J, L, M, N, O, P e Q
SEIU-SEIV	Enterotoxinas like U, U2 e V
SEI/	enterotoxinas like

RESUMO

A espécie *Anomalocardia brasiliiana* é encontrada em abundância nas praias da costa brasileira e bastante apreciada na culinária nordestina. Neste estudo, objetivou-se a caracterização molecular de enterotoxinas e do gene de resistência *mecA* de *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos isolados de amostras da carne de *A. brasiliiana* na região metropolitana do Recife, Brasil. Isolados de amostras *in natura* (n=9), coletados no balneário de Mangue Seco, Igarassu-PE, foram identificados como *Staphylococcus xylosus* (4/9), *Staphylococcus cohnii* spp. *urealyticus* (4/9) e *Staphylococcus sciuri* (1/9). Dentre amostras comercializadas (n=21), foram identificados *Staphylococcus sciuri* (16/21), *Staphylococcus xylosus* (4/21) e *Staphylococcus lentus* (1/21). A determinação do perfil de resistência a antibióticos foi realizada seguindo orientações do CLSI. Os maiores índices de resistência foram observados em isolados de amostras *in natura* contra eritromicina (58,53%), penicilina (51,21%) e tetraciclina (43,9%). Isolados de amostras comercializadas apresentaram maior percentual de resistência à oxacilina (55,3%) e penicilina (36,8%). Todos os isolados foram caracterizados como coagulase-negativos e foram resistentes à oxacilina e/ou cefoxitina e positivos para a presença do gene *mecA*, mas sensíveis fenotipicamente à vancomicina. Ainda, os genes das enterotoxinas *seg* e *seh* foram detectados em 77,7 % e 88,8% dos isolados de amostras ambientais, contra 90,5% e 100% dos isolados de amostras comercializadas, respectivamente. Os resultados obtidos nesse estudo revelam a presença de *Staphylococcus* coagulase-negativos resistentes à meticilina portadores de genes toxigênicos no molusco bivalve *A. brasiliiana*. Este é primeiro relato de *Staphylococcus* coagulase-negativos resistentes à meticilina no molusco bivalve *A. brasiliiana*.

Palavras-chave: *mecA*, *Staphylococcus* coagulase-negativos, *Anomalocardia brasiliiana*, enterotoxinas, cefoxitina.

ABSTRACT

The species *Anomalocardia brasiliiana* is found in abundance on the beaches of the Brazilian coast and much appreciated in Northeastern cuisine. This study aimed to characterize molecular enterotoxins and resistance gene *mecA* in *Staphylococcus* spp. isolates of coagulase-negative beef samples *A. brasiliiana* in the metropolitan area of Recife, Brazil. Isolated from fresh samples (n = 9), collected in the resort of Mangue Seco, Igarassu-PE, were identified as *Staphylococcus xylosus* (4/9), *Staphylococcus cohnii* spp. *urealyticus* (4/9) and *Staphylococcus sciuri* (1/9). Among commercialized samples (n = 21) were identified *Staphylococcus sciuri* (16/21), *Staphylococcus xylosus* (4/21) and *Staphylococcus lentus* (1/21). The determination of antibiotic resistance profile was performed following the CLSI guidelines. The highest rates of resistance were observed in isolates from fresh samples against erythromycin (58.53%), penicillin (51.21%) and tetracycline (43.9%). Isolated from samples marketed presented greater resistance to oxacillin (55.3%) and penicillin (36.8%). All isolates were characterized as coagulase-negative and were resistant to oxacillin and / or cefoxitin and positive for the presence of *mecA* gene but phenotypically susceptible to vancomycin. Also, the genes for enterotoxins *seg* and *seh* were detected in 77,7% and 88,8% of isolates from environmental samples, versus 90.5% and 100% of the isolates of real samples, respectively. The results of this study reveal the presence of *Staphylococcus* coagulase-negative methicillin-resistant carriers of toxigenic genes in bivalve mollusk *A. brasiliiana*. This is first report of *Staphylococcus* coagulase-negative methicillin-resistant bivalve mollusk in *A. brasiliiana*.

Keywords: *mecA*, *Staphylococcus*, *Anomalocardia brasiliiana* coagulase-negative, enterotoxins, cefoxitin.

1. INTRODUÇÃO

A associação entre a elevada produção e a riqueza dos recursos pesqueiros tem sido imprescindível na geração de alimentos para populações em todo o mundo. Diversas espécies de moluscos bivalves são extraídas dos seus estoques naturais e consumidas em todo o mundo. Dentre elas, *Anomalocardia brasiliiana* é encontrada em abundância no litoral norte pernambucano, mais particularmente na Praia de Mangue Seco (LAVANDER et al., 2011). Tal espécie tem sido utilizada como bioindicador de coliformes termotolerantes, já que possui hábito alimentar filtrador, podendo reter em seus tecidos micro-organismos presentes no ambiente em que se encontra (PEREIRA et al., 2003).

Estudo identificou a presença de estafilococos produtores de enterotoxinas (ET) no molusco *A. brasiliiana* (AYULO et al., 1994). O alto teor protéico da carne desse molusco constitui um ambiente favorável para o desenvolvimento bacteriano e produção de ET (PEDROSA et al., 2001; OSTYN et al., 2010). Tal fato é de grande relevância considerando que a intoxicação estafilocócica é umas das mais frequentes doenças microbianas transmitidas por alimentos, em vários países, sendo capaz de causar vômito, diarreia, náusea e dores abdominais (ARGUDIN et al., 2010).

A capacidade enterotoxigênica não está restrita à *Staphylococcus aureus*, outras espécies produtoras de coagulase e *Staphylococcus* coagulase-negativos (SCN) também têm sido relatados como produtores de ET em alimentos (LAMAITA et al., 2005; MARIANO et al., 2007). Até o momento, foram descritas 22 ET, estando as clássicas SEA, SEB, SEC, SED e SEE mais associadas à surtos de intoxicação alimentar. Tais ET são proteínas extracelulares que possuem resistência à ação de enzimas proteolíticas, além de serem termoestáveis (BORGES et al., 2008).

Além da virulência associada à produção de ET, a resistência à meticilina e emergência de *Staphylococcus* resistentes à meticilina (MRS) tem despertado preocupação em todo o mundo. Essa resistência está condicionada à presença do gene *mecA* que codifica a proteína PBP2a com baixa afinidade por antibióticos beta-lactâmicos. Tal proteína é descrita como essencial para a síntese da parede celular bacteriana na presença do antimicrobiano. O gene *mecA* está localizado no cassete cromossômico estafilocócico *mec* (SCC). Atualmente são descritos onze tipos de SCC*mec*, estando os tipos IV e V classicamente associados com infecções comunitárias (DERESINSKI, 2005; TURLEJ et al., 2011).

A presença de estafilococos resistentes à meticilina em alimentos tem sido relatada (PEREIRA et al., 2009). Além disso, estudo recente realizou o isolamento de *Staphylococcus*

aureus resistentes à meticilina (MRSA) e *Staphylococcus* coagulase-negativos resistentes à meticilina no pescado (HAMMAD et al., 2012). Tal fato é de grande importância, já que o alimento contaminado por MRS pode facilitar a transferência de resistência aos antimicrobianos (HENNEKINNE et al., 2012).

Considerando o potencial patogênico de *Staphylococcus* spp., o presente trabalho objetivou a caracterização de *Staphylococcus* isolados de amostras *in natura* e comercializadas do molusco bivalve *A. brasiliana*, com ênfase na detecção dos genes das enterotoxinas e do gene *mecA*.

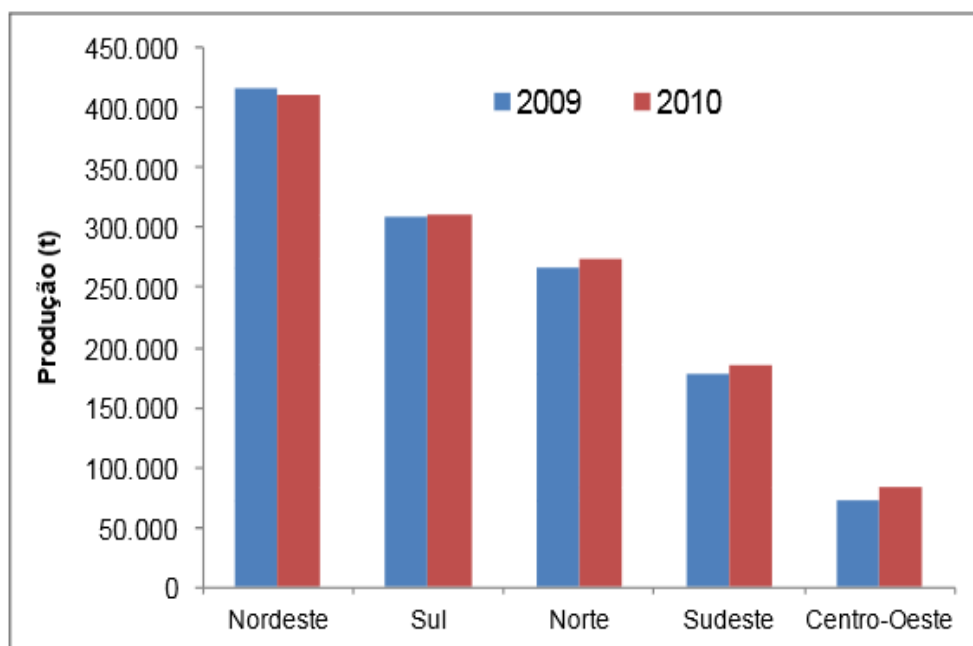
2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Recursos pesqueiros e pesca artesanal

De acordo com o Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal – RIISPOA, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, o termo pescado é uma definição genérica que inclui peixes, crustáceos, moluscos, anfíbios, quelônios, mamíferos marinhos e de água doce, utilizados na alimentação humana (BRASIL, 1997).

Em 2010, o Brasil foi responsável pelo total de 1.264.765 t de pescado. Nesse contexto, a região nordeste foi a maior produtora, com 410.532 t, representando 32,5% da produção nacional (MPA, 2010) (Figura 1).

Figura 1: Produção de pescado no Brasil (t) em 2009 e 2010 determinada por região.



Fonte: Ministério da Pesca e Aquicultura, 2010.

Na região nordeste brasileira, os recursos pesqueiros marinhos e estuarinos têm sido considerados importantes para o desenvolvimento da região, principalmente como meio de subsistência e fonte alimentar (CASTRO, 1997), sendo extraídos do ambiente através de atividades como a pesca artesanal, que é praticada por pescadores de comunidades ribeirinhas ao longo de todo litoral brasileiro.

Segundo a FAO (2004), estima-se que existam cerca de 36 milhões de pescadores, sendo 90% destes classificados como artesanais e a maioria se encontra nos países que estão em desenvolvimento. O Ministério da Pesca e Aquicultura (2011) ao abordar sobre o pescador artesanal destacou que o mesmo é

[...] o profissional que, devidamente licenciado pelo Ministério da Pesca e Aquicultura, exerce a pesca com fins comerciais, de forma autônoma ou em regime de economia familiar, com meios de produção próprios ou mediante contrato de parcerias, desembarcada ou com embarcações de pequeno porte.

Os moluscos bivalves estão entre os recursos economicamente mais importantes e a prática de sua coleta é conhecida como mariscagem. A comunidade de pescadores adquire bagagem cultural através de observações e aprendizagem prática, onde a arte da pesca é transmitida de pai para filho ao longo das gerações (CARNEIRO et al., 2008).

A coleta de mariscos é bastante comum nas comunidades litorâneas com baixo ou nenhum poder aquisitivo (JESUS; PROST, 2011), sendo realizada em sua grande maioria por mulheres, utilizando diversos os instrumentos como colheres, facas, ciscadores, baldes, além de rede de arrasto, pá e a própria mão (MONTELES et al., 2009). Independente da forma de coleta, as catadoras exercem alguma forma de manejo do recurso.

2.2 Molusco bivalve *Anomalocardia brasiliiana*

A classe Bivalvia abrange animais conhecidos como mariscos, ostras e mexilhões. São animais invertebrados de corpo mole, protegidos por um exoesqueleto e se caracterizam por apresentar uma concha composta por duas valvas. Além disso, possuem brânquias que assumem o papel de capturar alimentos e realizam as trocas gasosas (RUPPERT; BARNES, 1996; CHINA et al., 2003).

Dentre as diversas espécies presentes nessa classe encontra-se *Anomalocardia brasiliiana*, também conhecida como berbigão, vôngole, maçunin e chumbinho, variando de acordo com a região encontrada. Esse molusco têm sido coletado e comercializado nas praias de várias regiões

brasileiras há décadas, podendo ser encontrado em diferentes fases de desenvolvimento e habitando áreas com distintas características abióticas (RODRIGUES et al., 2010).

A. brasiliiana faz parte da família Veneridae que reúne cerca de 500 espécies viventes pertencentes a aproximadamente 50 gêneros e 12 subfamílias (CANAPA et al. 1996). Essa espécie vive enterrada no lodo e em águas rasas, sendo encontrada desde as Índias Ocidentais até o Uruguai, ocorrendo em toda a costa brasileira (RIOS, 1994).

Quanto à alimentação, Narchi (1974) relatou que o molusco *A. brasiliiana* é lamelibrânquio e a seletividade das partículas filtradas varia em tamanho de bacterioplâncton a zooplâncton móvel e, inclui matéria viva e não viva, mas de maneira geral muitas espécies são eficientes na retenção de material com tamanho entre 3 e 5µm (LEGALL et al, 1997; WARD; SHUMWAY, 2004; PRINS; ESCARAVAGE, 2005; LEHANE; DAVENPORT, 2006; TROTTE et al, 2007).

Em relação à qualidade nutricional, a carne de *A. brasiliiana* é rica em proteínas, minerais, lipídios e ácidos graxos poli-insaturados, podendo fazer parte de uma dieta saudável (PEDROSA et al., 2001; LIRA et al., 2004; AVEIRO, 2009). No entanto, sua composição pode variar conforme o local de coleta, disponibilidade de alimentos, estação do ano e grau de maturação (AVEIRO, 2007).

No litoral Norte Pernambucano, em especial na Praia de Mangue Seco, onde a prática de extrativismo de mariscos é bem conhecida e praticada rotineiramente, *A. brasiliiana* é encontrada naturalmente e mantém sua atividade reprodutiva durante todo o ano (LAVANDER et al., 2011). Assim, é possível observar a prática da mariscagem desta espécie pela população das comunidades litorâneas locais ao longo de todo o ano.

O processamento de *A. brasiliiana* na praia de Mangue Seco, realizado pelos marisqueiros, se dá de maneira artesanal e envolve precárias condições de higiene. Tal processo ocorre geralmente através da pré-fervura com água marinha, o que facilita a abertura das valvas para separação da carne através de peneiramento e posterior empacotamento, essa prática é conhecida como “bater marisco”. Após essa etapa, os pacotes contendo a carne do animal são transportados para venda nos estabelecimentos comerciais locais ou em suas residências (Figura 2).

Figura 2: Etapas de processamento do molusco *A. brasiliana* na praia de Mangue Seco, Igarassu. A- Pré-fervura; B- Armazenamento após a pré-fervura; C- Desconchamento, D- Empacotamento da carne do molusco.



Fotos: Bruno Carneval

2.3 Contaminação microbiológica dos moluscos bivalves

A microbiota presente no pescado está diretamente relacionada com a qualidade da água de onde vivem. Particularmente, a contaminação microbiológica de *A. brasiliana* é influenciada pelo regime de chuvas no litoral pernambucano, considerando que os níveis de coliformes na água geralmente aumentam com a precipitação pluviométrica (BATISTA, 2010). Isso é possível devido ao hábito alimentar desses animais, que ocorre através da filtração de grandes quantidades de água pelas brânquias. Assim, quando micro-organismos patogênicos e toxinas estão presentes na água em que se encontram, podem se acumular no aparelho digestivo do animal. Apesar de não contraírem doenças bacterianas, os moluscos podem atuar como portadores de micro-organismos patogênicos humanos, além de serem eficientes bioindicadores de poluição marinha (CDC, 1996; PEREIRA et al., 2006).

O consumo de moluscos geralmente se dá por ingestão da carne crua ou levemente cozida e, se por ventura, estiver contaminada por micro-organismos patogênicos que não tenham sido eliminados no trato digestivo dos moluscos ou durante o cozimento, podem ser potencialmente infecciosos para o consumidor. Dentre os principais agentes etiológicos causadores de tais infecções, estão vírus, bactérias e suas toxinas, fungos, protistas, trematódeos, poliquetas e copépodes (KINNE, 1983). No entanto, a contaminação microbiana pré-coleta

inclui principalmente uma grande variedade de vírus e bactérias patogênicas (HUSS et al., 2000; LEES, 2000).

Segundo Feldhusen (2000), as espécies bacterianas isoladas de frutos do mar, que podem causar doenças em humanos, podem ser classificadas em três grupos. No primeiro estão presentes os membros da família Vibrionaceae, tais como *Vibrio parahaemolyticus* e *V. cholerae*, sendo estas selvagens no ambiente marinho. O segundo grupo inclui espécies bacterianas introduzidas no ambiente marinho através de contaminação fecal, pertencentes principalmente à família Enterobacteriaceae, tais como *Escherichia coli*, *Salmonella* e *Shigella*. E por fim, fazendo parte do terceiro grupo estão as bactérias introduzidas no pescado através do processamento e estocagem inadequados, tais como *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus*.

Rippey (1994) relatou que as doenças decorrentes do consumo de frutos do mar ocorrem em escala epidêmica. Nos Estados Unidos, entre os anos de 1990 e 2000, ocorreram 66 epidemias envolvendo 3.229 casos associados à ingestão de moluscos bivalves (SMITH et al. 2001). Dessa forma, é de extrema importância que haja o controle na qualidade do ambiente de onde esses animais são extraídos, a fim de garantir um alimento seguro para o consumidor (AVEIRO, 2007). Além disso, tal monitoramento é importante, por considerar que doenças originárias do consumo de frutos do mar limitam significativamente a produção desses recursos pesqueiros (BACHÉRE et al., 1995; VERSCHUERE et al., 2000).

2.4 Gênero *Staphylococcus*

As espécies pertencentes ao gênero *Staphylococcus* apresentam morfologia esférica, são imóveis, produtoras de catalase e se coram fortemente como Gram-positivos (KLOOS; BANNERMAN, 1994). Além disso, são capazes de produzir energia (ATP) pelas vias respiratória e fermentativa (CROSSLEY, 1997). São mesófilas e seu crescimento geralmente ocorre na faixa de temperatura entre 7 a 48°C, sendo 37°C a temperatura ideal para seu desenvolvimento (JAY et al., 2005). Possuem tolerância à concentração salina, apresentando ótimo crescimento em concentrações de NaCl até 10%, sendo possível seu crescimento, embora mais lento, em concentrações de até 20% de NaCl (HENNEKINNE et al., 2010).

Atualmente, o gênero inclui mais de 31 espécies que se encontram presentes, principalmente, na pele e membranas mucosas de aves e mamíferos (KLOOS; BANNERMAN, 1994). O gênero faz parte da família Micrococcaceae, estando entre os principais grupos de

cocos Gram-positivos de importância clínica (HARVEY et al., 2008). São classificados em dois grupos, os estafilococos produtores de coagulase e os não produtores de coagulase.

2.4.1 Estafilococos coagulase positivo

Dentre as espécies capazes de produzir a coagulase, *Staphylococcus aureus* é o principal patógeno humano, responsável por infecções nosocomiais e comunitárias (BIEN et al., 2011). A produção de coagulase, característica de diferenciação no gênero, resulta na capacidade de transformar o fibrinogênio em fibrina e a consequente coagulação do plasma sanguíneo (PEREIRA et al., 2000; WONG; BERGDOLL, 2002). De acordo com Silva et al., (2000), a maioria dos laboratórios realiza a prova da coagulase e/ou termonuclease para identificação das cepas de *S. aureus*.

Apesar dessa espécie fazer parte da microbiota natural em humanos, pode produzir infecções oportunistas, sendo o maior risco associado à indivíduos com a situação imunológica comprometida (KONEMAN et al., 2006). A frequência dessas infecções é maior em portadores naturais da espécie (VON EIFF et al., 2001). Os indivíduos não portadores, geralmente adquirem infecções por este patógeno através da ingestão de alimentos contaminados.

S. aureus possui a capacidade de produzir uma variedade de fatores de virulência, o que o torna um patógeno versátil capaz de causar várias infecções (FOSTER; HOOK, 1998; LOWY, 1998; DINGES et al., 2000) . Tais fatores de virulência promovem a colonização do tecido e danos teciduais permitindo sua sobrevivência no interior das células do hospedeiro. Além disso, possui capacidade de invadir uma variedade de fagócitos não profissionais *in vitro*, incluindo fibroblastos (SINHA et al., 1999), osteoblastos (JEVON et al., 1999) e células endoteliais (DZIEWANOWSKA et al., 1999).

Após a invasão tecidual, *S. aureus* é capaz de escapar das defesas do hospedeiro e agentes antibacterianos, resultando na sua multiplicação e posterior disseminação. Este comportamento é devido à uma série de reguladores que podem resultar na secreção de proteínas que lisam as células do hospedeiro, facilitando a sua disseminação (CHEUNG et al., 1992; NOVICK et al., 1993).

Dentre os fatores de virulência associados à espécie *S. aureus*, estão a produção das hemolisinas α , β , γ e δ , ET, leucocidina, estafiloquinase, toxina do choque tóxico, etc. Na área de alimentos somente as enterotoxinas possuem importância, como causadoras de intoxicação alimentar estafilocócica (FRANCO; LANDGRAF, 2008; PINCHUK et al., 2010).

2.4.2 Estafilococos coagulase negativo

As espécies pertencentes a esse grupo se diferenciam de *S. aureus* por não possuírem a capacidade de coagular o plasma sanguíneo. Devido a não produção da coagulase e a presumida importância da mesma na virulência, os estafilococos pertencentes a este grupo foram frequentemente citados como não patogênicos (HUEBNER; GOLDMANN, 1999). No entanto, estudos recentes têm invertido essa situação. Entre os anos de 1990 e 1995, com base nos dados obtidos do Sistema Nacional de Vigilância de Infecções Nosocomiais (NNIS), foi mostrado que os estafilococos não produtores da coagulase (ECN) foram responsáveis por 11% das infecções no ambiente hospitalar, sendo a terceira principal causa de tais infecções (BOYCE, 1997).

Diversas espécies de ECN são conhecidas atualmente, tais como: *Staphylococcus epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. saprophyticus*, *S. cohnii*, *S. xylosus*, *S. capitis*, *S. warneri*, *S. hominis*, *S. simulans*, *S. caprae*, *S. lugdunensis*, *S. schleiferi*, *S. gallinarum* (KLOOS; BANNERMAN, 1994).

Por serem comensais da pele humana, os ECN estão entre os principais agentes etiológicos responsáveis por infecções associadas ao uso de dispositivos protéticos como marcapasso, de abscessos superficiais, de infecções da pele, de infecções oftalmológicas pós-cirúrgicas e de infecções urinárias (KLOOS; BANNERMAN, 1994; TAN et al., 2006). Além dessas doenças, os ECN também estão envolvidos em casos de intoxicação alimentar, sendo produtores de ET (LAMAITA et al., 2005; STAMFORD et al., 2006; VERAS et al., 2008), mesmo produzindo quantidades inferiores quando comparados com *S. aureus*, principal espécie de importância médica produtora de coagulase (ORDEN et al., 1992).

2.5 Intoxicação alimentar por estafilococos

Em estudo recente realizado por Abdelzaher et al. (2010), foi mostrado que as praias marinhas são ótimos reservatórios para bactérias patogênicas. Dentre elas, *S. aureus* e *S. aureus* meticilina resistentes (MRSA). Estudo realizado por Plano et al. (2011) mostrou a correlação entre os perfis dos *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina isolados da praia com isolados de banhistas frequentadores da praia, indicando que o banhista é fonte de contaminação primária. Tal fato é possível já que de 20% a 60% dos adultos são portadores de *S. aureus*, sem apresentar qualquer tipo de doença (GERMANO; GERMANO, 2001). Além disso, tais indivíduos são importantes fontes de contaminação para os alimentos por eles manipulados (FRAZIER; WESTHOFF, 1993). Particularmente, a contaminação dos moluscos bivalves por

Staphylococcus spp. é geralmente associada à falta de higiene durante a manipulação e comercialização do pescado (ALVES et al., 2002).

Segundo Normanno et al. (2005), o controle da contaminação por *Staphylococcus* spp. pode ser realizado através do cumprimento dos padrões de higiene, incluindo o cuidado na manipulação em todo o processamento do alimento, cozimento e estocagem imediata sob temperaturas inferiores a 7 °C. A intoxicação causada por *S. aureus*, constitui um dos tipos mais comuns de doenças transmitidas por alimentos (DTA) (LE LOIR et al., 2003). A versatilidade nutricional e a capacidade de crescer em diferentes condições ambientais, favorecem o desenvolvimento de *S. aureus* em alimentos (CARMO, 2002; LE LOIR et al., 2003).

A intoxicação alimentar estafilocócica se caracteriza como uma doença com episódios de gastroenterite aguda apresentando evolução rápida e curta duração (BERGDOLL, 1990; SU; LEE WONG, 1997). Outras espécies produtoras de coagulase têm sido caracterizadas como enterotoxigênicas, como *S. intermedius* e *S. hyicus* (HIROOKA et al., 1988). Além disso, é relatada a capacidade toxigênica de espécies não produtoras de coagulase, incluindo *S. cohnii*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *S. sciuri*, *S. warneri*, *S. chromogenes*, *S. lentus*, *S. xylosus* (VERNOZY et al., 1996; UDO et al. 1999, CUNHA et al., 2006).

Geralmente as intoxicações estão associadas à ingestão de pelo menos 100 ng de ET e contagens entre 10⁵ a 10⁶ UFC (Unidades Formadoras de Colônias) de estafilococos/g de alimento (LANCETTE; TATINI, 1992; PARK et al., 1992; WONG; BERGDOLL, 2002).

As ET agem no trato gastrointestinal causando vários sintomas, sendo eles: náusea, vômito, cólicas abdominais e diarreia que surgem geralmente dentro de 2 a 6 horas após a ingestão do alimento contaminado. Normalmente, não há febre nem sinais neurológicos e o tratamento consiste da reidratação do indivíduo para recuperação completa (KONEMAN et al., 2006).

Através do estímulo, transferido pelo nervo vago ao centro do vômito, ocorre a retroperistalsia do estômago e do intestino delgado, provocando intensos episódios de vômitos (BALABAN; RASOOLY, 2000; DINGES et al., 2000). A diarreia, outro sintoma bastante comum, é resultante da inibição de água e reabsorção de eletrólitos no intestino delgado (DINGES et al., 2000).

A doença, na maioria das vezes, é auto-limitante e os sintomas desaparecem entre 24 a 48 horas dos primeiros sinais. No entanto, podem ocorrer casos graves que levem a hospitalização, neste caso crianças, idosos e indivíduos com baixa imunidade são os mais predispostos a este quadro (MURRAY, 2005), provavelmente devido a suscetibilidade à toxina ou a incapacidade de regular a homeostase sob o stress da intoxicação (VERAS et al., 2008). Além disso, a gravidade

da doença está condicionada a quantidade de alimento ingerido, a quantidade de toxina no alimento ingerido e a saúde do indivíduo (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

Estima-se que as intoxicações causadas por estafilococos sejam bastante comuns no Brasil, sendo a maioria dos casos não investigados ou não notificados (SANTANA et al., 2006). A presença de ET em estafilococos isolados do pescado já foi verificada, incluindo moluscos bivalves (AYULO et al., 1994; TORRES, 2008; VÁZQUEZ-SÁNCHEZ et al., 2012).

2.5.1 Enterotoxinas estafilocócicas (ET)

As ET são proteínas solúveis em água, monoméricas e possuem peso molecular variando entre 26 e 29 mil daltons, são ricas em lisina, ácido glutâmico e aspártico, com duas cisteínas formando ponte dissulfeto (BERGDOLL, 1971). São pertencentes à família das toxinas pirogênicas que estão agrupadas de acordo com sua função biológica e propriedades físico-químicas (MARRACK; KAPLER, 1990; MONDAY; BOHACH, 1999). Assim, possuem características comuns dessa família, como pirogenicidade, supressão imunológica e efeito mitogênico em células T (LE LOIR, 2003).

Atualmente existem 22 ET descritas, as clássicas: SEA, SEB, SEC, SED, SEE, os novos tipos SEG, SEH, SEI, SER, SES, SET, e as que não possuem atividade emética ou que ainda não foram testadas, as denominadas enterotoxinas-like (*SE/ls*), *SE/IJ*, *SE/K*, *SE/L*, *SE/M*, *SE/N*, *SE/O*, *SE/P*, *SE/Q*, *SE/U*, *SE/U2* e *SE/V* (ARGUDÍN et al., 2010). Os genes que codificam as diferentes ET são encontrados em diferentes elementos genéticos móveis tais como, prófagos, plasmídeos, ilhas de patogenicidade (SAPI), *cluster* composto por genes que codificam as ET (*egc*) e próximos ao cassete cromossômico estafilocócio *mec* (SCC*mec*) (ALTBOUM et al., 1985; HU et al., 2011). Em estudo realizado por Hu et al. (2011), foram encontrados os genes das ET associados ao SCC*mec* dos tipos I e II.

As ET são resistentes à ação das enzimas proteolíticas pepsina, renina, tripsina e papaína, o que permite sua passagem pelo trato gastrointestinal sem perda de atividade (HUY, 1994). Além disso, são termoestáveis e sua inativação está condicionada à temperatura, pureza, composição e pH do meio (SANTANA et al., 2010). De acordo com Baird-Parker (1990), para a inativação da toxina, seriam necessários de três a oito minutos a 121°C, já o Food and Drug Administration (FDA, 2001), citou que a toxina estafilocócica é sensível entre 98,9 °C por 68,5 minutos ou 126,7°C por 6,2 minutos.

Estudos têm mostrado que a enterotoxina SEC é a mais termoestável, seguida por SEB e SEA (NOTERMANS et al., 1988). Estas ET são produzidas durante a fase logarítmica ou

durante a transição da fase logarítmica a fase estacionária (OTERO et al., 1990; BETLEY et al., 1992).

As ET são importantes superantígenos, possuindo capacidade de se ligar diretamente à molécula do complexo de histocompatibilidade de classe II (MHC II), sem o processamento natural de antígenos, sendo capazes de estimular a proliferação não-específica de células T, e portanto, produzir excessivas citocinas, tal como a interleucina I e II (IL-1; IL-2), interferon gamma (IFN- γ) e o fator de necrose tumoral (TNF- α) (MARRACK e KAPLES, 1990; BALABAN; RASOOLY, 2000). Essa hiper produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias causam o choque e a inflamação mediada pelos superantígenos.

Com relação à investigação de ET em cepas estafilocócicas, as técnicas de análise molecular permitem a caracterização de culturas bacterianas isoladas de alimentos. Dentre estas, a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) tem se mostrado um método rápido, de baixo custo, fácil execução e bastante eficaz como ferramenta de triagem e caracterização, detectando a sequência de nucleotídeos dos genes específicos das ET (SU; WONG, 1997; ZAREI et al., 2012). Além disso, uma variante da PCR, conhecida como PCR multiplex, possibilita que através de uma única reação vários genes responsáveis pelas toxinas sejam detectados, contribuindo para o estudo molecular destas bactérias e seu envolvimento em doenças de origem alimentar (BECKER, et al., 1998; ROSEC; GIRARD, 2002; HIROTAKI et al., 2011).

2.6 Resistência aos antimicrobianos no Gênero *Staphylococcus*

Inicialmente, os antibióticos beta-lactâmicos foram tradicionalmente utilizados no tratamento de infecções estafilocócicas. O surgimento de resistência a essa classe de antibióticos teve início precocemente na década de 40, logo após a penicilina G ser introduzida no tratamento de infecções causadas por *S. aureus* (CHAMBERS, 2001). A resistência é resultante da produção da enzima penicilinase, que inativa a ação do antibiótico pela hidrólise do anel β -lactâmico. O gene responsável por codificar essa enzima é denominado *BlaZ*, que está classificado em quatro tipos de acordo com as diferenças sorológicas (A, B, C e D). Os tipos A, C e D estão localizados em plasmídeos, já o tipo B está presente no cromossomo (VOLADRI; KERNODLE, 1998).

Após o surgimento de resistência à essa classe de antibióticos, houve a introdução de penicilinas semi-sintéticas resistentes à ação das penicilinas, na década de 1960, possibilitando um avanço terapêutico no tratamento de infecções estafilocócicas. No entanto, com o uso dessas penicilinas, no ano de 1961, surgiram cepas resistentes que foram denominadas *Staphylococcus*

aureus meticilina resistentes (MRSA) (JEVONS, 1961). A espécie desenvolveu essa resistência através da aquisição do gene *mecA*, que codifica a proteína ligadora de penicilina (PBP2a), uma proteína alterada com baixa afinidade pelos antibióticos β -lactâmicos. Assim, a resistência à meticilina possui especial importância pois é um marcador de resistência a todos os beta-lactâmicos, incluindo as cefalosporinas e carbapenemos (CHAMBERS, 1997; CRISOSTOMO, 2001).

O gene *mecA* está localizado no elemento genético móvel denominado cassette cromossômico estafilocócio *mec* (SCC*mec*), sendo caracterizado pela presença de repetições terminais diretas e invertidas, dois componentes genéticos essenciais (complexos *mec* e *ccr*) e as regiões *junkyard* (ITO et al., 2001; MA et al., 2002; ITO et al., 2004). Tais repetições terminais propiciam a inserção do elemento móvel no genoma bacteriano, especificado pela complementaridade de bases.

A integração e a excisão do SCC*mec* em um locus específico do genoma (*attB_{sc}*) é realizado por genes de recombinases presentes nesse cassette cromossômico (*ccrA* e *ccrB*), que estão presentes em todos os SCC*mec*, permitindo a transferência horizontal intra e interespecies do SCC*mec* (ITO et al., 1999; GORDON; LOWY, 2008). Já a região do cassette denominada *junkyard* compreende às sequências próximas aos loci *mec* e *ccr* e incluem genes ou pseudogenes que não parecem ter utilidade para a célula bacteriana (KATAYAMA et al., 2000; KATAYAMA et al., 2001; ITO et al., 2003). Geralmente, os isolados que possuem SCC*mec* dos tipos IV ou V têm origem comunitária (CA-MRSA), já os tipos I, II e III possuem origem hospitalar (HA-MRSA) (DERESINSKI, 2005).

De maneira geral, a resistência antibiótica entre as espécies do gênero *Staphylococcus* pode ser codificada no cromossomo ou mediada por plasmídeos e possui basicamente três mecanismos distintos de resistência a meticilina, como a hiperprodução de beta-lactamases, a presença de uma proteína ligadora de penicilina alterada denominada PBP2a e modificações na capacidade de ligação das PBPs (TOMASZ et al., 1989). Esses três mecanismos podem estar presentes, inclusive interagindo entre si (DE LENCASTRE et al., 1991).

Interessantemente, os ECN que antes eram considerados apatogênicos, apresentam maior frequência de resistência à antibióticos que a espécie virulenta *S. aureus* (JONH; HARVIN, 2007). Possuem também os maiores índices de resistência à meticilina (>70%) em todo o mundo (DIEKEMA et al., 2001). Dentre as espécies mais importantes causadoras de infecções nosocomiais, *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus haemolyticus* apresentam resistência à meticilina em torno de 80% (GROSSERODE; WENZEL, 1991). As infecções causadas pelas

espécies coagulase-negativas estão raramente associadas à comunidade, no entanto, são bastante comuns no ambiente hospitalar (BARBIER et al., 2010).

Uma alternativa para o tratamento de infecções estafilocócicas causadas por espécies produtoras de penicilinases e resistentes à meticilina/oxacilina é a vancomicina, antibiótico pertencente à classe dos glicopeptídeos que atua na inibição da síntese da parede celular (BENJAMIN et al., 2010). No entanto, casos recentes de resistência à vancomicina são relatados, com a aquisição do gene plasmidial *vanA* obtido de enterococos resistentes a este antibiótico (CHANG et al., 2003; TENOVER et al., 2004), inclusive entre espécies coagulase-negativas (SHWALBE et al., 1987).

A ocorrência de resistência à meticilina e vancomicina tem se tornado um problema de saúde pública em todo o mundo. Na América latina, a proporção de estafilococos resistentes à meticilina encontra-se em ascensão (LUNA et al., 2010). Tal situação é resultado do uso excessivo de antibióticos que favorece o surgimento de cepas multirresistentes. Atualmente, além do ambiente hospitalar (GRAFFUNDER; VENEZIA, 2002), os estafilococos multirresistentes tem sido isolados da comunidade (AMIR et al., 2010); de animais (LEONARD; MARKEY, 2008), de alimentos (WANG et al., 2012), inclusive do pescado (HAMMAD et al., 2012), gerando um risco constante para a saúde humana.

Considerando a importância da resistência aos antimicrobianos no gênero *Staphylococcus*, técnicas eficazes para a rápida identificação das espécies resistentes são essenciais. Para tanto, são utilizados diversos métodos, dentre eles, a técnica de PCR ganha destaque por ser considerada “padrão ouro” na identificação de genes de resistência aos antimicrobianos, como o gene *mecA* (TOKUE et al., 1992). Essa técnica tem sido bastante utilizada em diversos trabalhos com eficácia (XU et al., 2012).

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Realizar a caracterização molecular de enterotoxinas e do gene *mecA* em *Staphylococcus* isolados de amostras *in natura* e comercializadas do molusco *Anomalocardia brasiliiana* na Região metropolitana do Recife, Pernambuco.

3.2 Específicos

- Isolar e caracterizar em relação à produção da enzima coagulase, estafilococos da carne de *A. brasiliiana in natura* e comercializados na região metropolitana do Recife;
- Determinar o perfil de sensibilidade a antibióticos dos isolados de *Staphylococcus* spp.;
- Identificar no nível de espécie os estafilococos resistentes à oxacilina e/ou cefoxitina;
- Investigar a presença do gene *mecA* nos isolados que apresentaram resistência à oxacilina e/ou cefoxitina;
- Investigar a presença dos genes *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg* e *seh* relacionados à produção das enterotoxinas SEA, SEB, SEC, SED, SEE, SEG e SEH, respectivamente.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELZAHER A. M. et al. Presence of pathogens and indicator microbes at a non-point source subtropical recreational marine beach. **Applied Environmental Microbiology**, v. 76, p. 724-732, 2010.

ALTBOUM, Z.; HERTMAN, I.; SARID S. Penicillinase plasmid linked genetic determinants for enterotoxins B and C1 production in *Staphylococcus aureus*. **Infection and Immunity**, v.47, p. 514–521, 1985.

ALVES, L.C. et al. Comercialização de Pescado no Distrito Federal: Avaliação das condições. **Revista Higiene Alimentar**, v.16, p. 41-49, 2002.

AMIR, N.H. et al. Spread of community-acquired meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* skin and soft-tissue infection within a family: implications for antibiotic therapy and prevention. **Journal of Medical Microbiology**, v. 59, p. 489-492, 2010.

ARGUDÍN, M.A.; MENDOZA, M.C.; RODICIO, M.R. Food Poisoning and *Staphylococcus aureus* Enterotoxins. **Toxins**, v.2, p. 1751-1773, 2010.

AVEIRO, M. V. **Análise nutricional, microbiológica e histológica do berbigão *Anomalocardia brasiliiana* da reserva extrativista marinha do pirajubaé (REMAPI), Florianópolis / SC.** Dissertação (Mestrado em nutrição) – Universidade Federal de Santa Catarina, 2007.

AVEIRO, M.V.; BARRERA-ARELLANO, D.; TRAMONTE, V.L.C.G. Composição lipídica do molusco marinho berbigão *Anomalocardia brasiliiana* (Gmelin, 1791) “in natura” e cozido. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, v. 59, p. 337-341, 2009.

AYULO, A.M.; MACHADO, R.A.; SCUSSEL, V.M. Enterotoxigenic *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in fish and seafood from the southern region of Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, v. 24, p. 171-178, 1994.

BACHERE, E. et al. Knowledge and research prospects in marine mollusk and crustacean immunology. **Aquaculture**, v. 132, p. 17-32, 1995.

BAIRD-PARKER, A.C. The staphylococci - an introduction. **Journal of Applied Bacteriology Supplied**, v.69, p. 1S-8S, 1990.

BALABAN, N.; RASOOLY, A. Staphylococcal enterotoxins. **International Journal of Food Microbiology**, v.61, p. 1-10, 2000.

BARBIER, F. et al. Methicillin-Resistant Coagulase-Negative Staphylococci in the Community: High Homology of SCCmec IVa between *Staphylococcus epidermidis* and Major Clones of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 202, p. 270–281, 2010.

BATISTA, J.E.C. **Qualidade microbiológica da água marinha e do marisco *Anomalocardia brasiliana* (Gmelin, 1791) na Praia de Mangue Seco, litoral norte de Pernambuco-Brasil.** Monografia (Graduação em Ciências Biológicas), Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2010.

BECKER, K.; ROTH, R.; PETERS, G. Rapid and specific detection of toxigenic *Staphylococcus aureus*: Use of two multiplex PCR enzyme immunoassay for amplification and hybridization of staphylococcal enterotoxin genes, exfoliative toxin genes, and toxic shock syndrome toxin 1 gene. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, p. 2548-2553, 1998.

BENJAMIN, P. et al. Reduced vancomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus*, including vancomycin-intermediate and heterogeneous vancomycin-intermediate strains: resistance mechanisms, Laboratory detection, and clinical implications. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 23, p. 99-139, 2010

BERGDOLL, M.S. Identification of enterotoxin E. **Infection and Immunity**, v.4, p.5593-5595, 1971.

BERGDOLL, M.S. Analytical methods for *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Food Microbiology**, v.59, p.139-145, 1990.

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

BIEN, J.; SOKOLOVA, O.; BOZKO, P. Characterization of virulence factors of *Staphylococcus aureus*: novel functions of known virulence factors that are implicated in activation of airway epithelial proinflammatory response. **Journal of Pathogens**, v. 2011, p. 13, 2011.

BORGES, M.F. et al. Perfil de contaminação por *Staphylococcus* e suas enterotoxinas e monitorização das condições de higiene em uma linha de produção de queijo de coalho. **Ciência Rural**, v.38, p. 1431-1438, 2008.

BOYCE, J.M. Epidemiology and prevention of nosocomial infections. In: CROSSLEY, K.B.; ARCHER, G.L. The Staphylococci in Human Disease. **Churchill Livingstone**, v.1, p. 309-329, 1997.

BRASIL. **Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal RIISPOA**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Rio de Janeiro: S.I.A., 1997.

CANAPA, A. et al. Phylogenetic analysis of Veneridae (Bivalvia): comparison of molecular and paleontological data. **Journal of Molecular Evolution**, v. 43, p. 517-522. 1996.

CARMO, L.S. et al. Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in Minas cheese and raw milk in Brazil. **Food Microbiology**, v.19, p. 9-14, 2002.

CARNEIRO, M.A.B.; FARRAPEIRA, C.M.R.; SILVA, K.M.E. O manguezal na visão etnoecológica dos pescadores artesanais do Canal de Santa Cruz, Itapissuma, Pernambuco, Brasil. **Biotemas**, v. 21, p. 147-155, 2008.

CASTRO, A.C.L. **Aspectos ecológicos da Ictiofauna da Ilha de São Luís - MA**. Tese (Doutorado), Universidade Federal do Maranhão, 1997.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL (CDC). Surveillance for foodborne disease outbreaks – United States, 1988-1992. **Morbidity and Mortality Weekly Reports**, v. 45, p.S5-5, 1996.

CHAMBERS, H.F. Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. **Clinical Microbiology Review**, v. 10, p. 781-791, 1997.

CHAMBERS, H.F. The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*? **Emerging Infectious Diseases**, v.7, p. 178–182, 2001.

CHANG, S. et al. Infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the *vanA* resistance gene. **The New England Journal of Medicine**, v. 348, p. 1342-1347, 2003.

CHEUNG, A. et al. Regulation of exoprotein expression in *Staphylococcus aureus* by a locus (*sar*) distinct from *agr*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, p. 6462–6466, 1992.

CHINA, B.; DE SCHETZEN, M.A; DAUBE, G. Les mollusques bivalves, des aliments dangereux ? **Annales Médecine Vétérinaire**, v. 147, p. 413-422, 2003.

CRISOSTOMO, M. I. et al. The evolution of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: Similarity of genetic backgrounds in historically early methicillin susceptible and resistant isolates and contemporary epidemic clones. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 98, p. 9865- 9870, 2001.

CROSSLEY, K.B.; ARCHER, G. **The Staphylococci in human disease**. New York, Churchill Livingstone, 682 p., 1997.

CUNHA, M.L.R.S. et al. Detection of enterotoxins genes in coagulase-negative staphylococci isolated from foods. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 64- 69, 2006.

DE LENCASTRE, H.S.A. et al. Multiple mechanisms of methicillin-resistance and improved methods for detection in clinical isolates of *S. aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.35, p. 632-639, 1991.

DERESINSKI, S. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an evolutionary, epidemiologic, and therapeutic odyssey. **Clinical Infectious Diseases**, v. 40, p. 562-573, 2005.

DIEKEMA, D.J. et al. Survey of Infections Due to *Staphylococcus* Species: Frequency of Occurrence and Antimicrobial Susceptibility of Isolates Collected in the United States, Canada,

Latin America, Europe, and the Western Pacific Region for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997–1999 . **Clinical Infectious Disease**, v. 15, S114-32, 2001.

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

DZIEWANOWSKA, K. et al. Fibronectin binding protein and host cell tyrosine kinase are required for internalization of *Staphylococcus aureus* by epithelial cells. **Infection and Immunity**, v. 67, p. 4673–4678, 1999.

FAO. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2008**. Rome: FAO Fisheries and Aquaculture Department, Food and Agriculture Organization of the United Nations, 196 p., 2004.

FDA. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Center for Food Safety and Applied Nutrition. **Bacterial Pathogens Growth and Inactivation**. 3. ed, junho, 2001. Disponível em: <<http://seafood.ucdavis.edu/haccp/compendium/chapt19.htm#Heat> Resistance. Acesso em: 23/11/12.

FELDHUSEN, F. The role of seafood in bacterial food borne disease. **Microbe Infection**, v. 2, p. 1651-1660, 2000.

FOSTER, T.J.; HOOK, J. Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. **Trends in Microbiology**, v. 6, p. 484-488, 1998.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Editora Atheneu, 182 p., 2008.

FRAZIER, W. C.; WESTHOFF, D. C. **Microbiologia de los alimentos**. 4º Ed. Zaragoza: Acribia, 681 p., 1993.

GERMANO, P.M.L.; GERMANO, M.I.S. **Higiene e Vigilância Sanitária dos Alimentos**. 2º Ed. São Paulo: Varela, 629 p., 2001.

GRAFFUNDER, E.M.; VENEZIA, R. Risk factors associated with nosocomial methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infection including previous use of antimicrobials. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 49, p. 999-1005, 2002.

GROSSERODE, M.H.; WENZEL, R.P. The continuing importance of staphylococci as major hospital pathogens. **Journal of Hospital Infection**, v. 19, p. 3-17, 1991.

GORDON, R.J.; LOWY, F.D. Pathogenesis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. **Clinical Infectious Diseases**, v.46, S350–S359, 2008.

HAMMAD, A.M. et al. Occurrence and characteristics of methicillin-resistant and -susceptible *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci from Japanese retail ready-to-eat raw fish. **International Journal of Food Microbiology**, v. 3, p.286-289, 2012.

HARVEY, R.A. et al. **Microbiologia Ilustrada**. Porto Alegre: Artmed, 2º Ed., 448 p., 2008.

HENNEKINNE, J.A. et al. How should Staphylococcal food poisoning outbreaks be characterized? **Toxins**, v. 2, p. 2106–2116, 2010.

HENNEKINNE, J.A.; BUYSER, M.L.; DRAGACCI, S. *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 36, p. 815-836, 2012.

HIROOKA, E.Y. et al. Enterotoxigenicity of *Staphylococcus intermedius* of canine origin. **International Journal of Food Microbiology**, v. 7, p. 185-91. 1988.

HIROTAKI, S. et al. Rapid and Accurate Identification of Human-Associated Staphylococci by Use of Multiplex PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, p. 3627-3631, 2011.

HU, D.L. et al. Superantigenic toxin genes coexist with specific staphylococcal cassette chromosome *mec* genes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Tohoku Journal of Experimental Medicine**, v. 225, p. 161-9, 2011.

HUEBNER, J.; GOLDMANN, D.A. Coagulase-negative staphylococci: Role as Pathogens. **Annual Review Medicine**, v.50, p. 223-236, 1999.

HUSS, H. H.; REILLY, A.; KARIM BEN EMBAREK, P. Prevention and control of hazards in seafood. **Food Control**, v. 11, p. 149-156, 2000.

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

ITO, T.; KATAYAMA, Y.; HIRAMATSU, K. Cloning and nucleotide sequence determination of the entire mec DNA of pre-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* N315. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, p. 1449-58, 1999.

ITO, T. et al. Structural comparison of three types of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, p.1323-1336, 2001.

ITO, T. et al. Insights on antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* from its whole genome: genomic island SCC. **Drug Resistance Updates**, v.6, p.41-52, 2003.

ITO, T. et al. Novel type V staphylococcal cassette chromosome mec driven by a novel cassette chromosome recombinase, ccrC. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, p. 2637-51, 2004.

JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos**. Ed. Artmedia. 6° Ed., 712 p., 2005.

JESUS, R.S.; PROST, C. Importância da atividade artesanal de mariscagem para as populações nos municípios de Madre de Deus e Saubara, Bahia. **GEOUSP: espaço e tempo**, p. 123-137, 2011.

JEVON, M.C. et al., Mechanisms of internalization of *Staphylococcus aureus* by cultured human osteoblasts. **Infection and Immunity**, v. 67, p. 2677–2681, 1999.

JEVONS, M.P. "Celbenin"-resistant Staphylococci. **British Medical Journal**, v. 1, p. 124-125, 1961.

JONH, J.F.; HARVIN, A.M. History and evolution of antibiotic resistance in coagulase-negative staphylococci: Susceptibility profiles of new anti-staphylococcal agents. **Therapeutics and Clinical Risk Management**, v. 3, p. 1143–1152, 2007.

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

KATAYAMA, Y.; ITO, T.; HIRAMATSU, K. Genetic organization of the chromosome region surrounding *mecA* in clinical staphylococcal strains: role of IS431 mediated *mecI* deletion in expression of resistance in *mecA*-carrying, low-level methicillin resistant *Staphylococcus haemolyticus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.45, p.1955-1963, 2001.

KINNE, O. **Diseases of marine animals**. Biologische anstalt Helgoland, Hamburg, 571 p., 1983.

KLOOS, W.E.; BANNERMAN, T.L. Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 7, p. 117-40, 1994.

KONEMAN, E. W. et al. Diagnóstico microbiológico. Editora MEDSI, São Paulo, 1465 p., 6º Ed., 2006.

LAMAITA, H.C. et al. Contagem de *Staphylococcus* sp. e detecção de enterotoxinas estafilocócicas e toxina da síndrome do choque tóxico em amostra de leite cru refrigerados. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, p. 702-709, 2005.

LANCETTE, G.A.; TATINI, S.R. *Staphylococcus aureus*. In: VANDRZANT, C. **Compendium of methods for the Microbiological examination of foods**. 3º ed. Washington: American Public Health Association, 1992.

LAVANDER, H.D. et al. Biologia reprodutiva da *Anomalocardia brasiliiana* (GMELIN, 1791) no litoral norte de Pernambuco-Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 6, p. 344-350, 2011.

LE LOIR, Y.; BARON, F.; GAUTIER, M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. **Genetics and Molecular Research**, v.2, p.63-76, 2003.

LEES, D. Viruses and bivalve shellfish. **International Journal of Food Microbiology**, v. 59, p. 81-116, 2000.

LEGALL, S.; HASSEN, M.B.; LEGALL, P. Ingestion of a bacterivorous ciliate by the oyster *Crassostrea gigas*: protozoa as a trophic link between picoplankton and benthic suspension-feeders. **Marine Ecology Progress Series**, v. 152, p. 301–306, 1997.

LEHANE, C.; DAVENPORT, J. A15-month study of zooplankton ingestion by farmed mussels (*Mytilus edulis*) in Bantry Bay, Southwest Ireland. **Estuarine Coastal Shelf Science**, v. 67, p. 645-652, 2006.

LEONARD, F.C.; MARKEY, B.K. Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* in animals: a review. **The Veterinary Journal**, v. 175, p. 27-36, 2008.

LIRA, G. M. et al. Perfil de ácidos graxos, composição centesimal e valor calórico de moluscos crus e cozidos com leite de coco da cidade de Maceió-Al. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.40, p. 529-537, 2004.

LOWY, F.D. *Staphylococcus aureus* infections. **The New England Journal of Medicine**, v. 339, p. 520- 532, 1998.

LUNA, C.M. et al. Treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Latin America. **Brazilian Journal Infectious Diseases**, v.14, S119-S127, 2010.

MA, X.X. et al. Novel type of staphylococcal cassette chromosome *mec* indentified in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.46, p.1147-1152, 2002.

MARIANO, F.A. et al. Produção de enterotoxinas por *Staphylococcus* isolados de leite de cabras do estado do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 14, p. 105-110, 2007.

MARRACK, P.; KAPPLES, J. The staphylococcal enterotoxins and their relatives. **Science**, v. 248, p. 705-711, 1990.

MONDAY, S.R.; BOHACHM G.A. Properties of *Staphylococcus aureus* enterotoxins and toxic shock syndrome toxin-1. In: ALOUF, J.E.; FREER, J.H. (Ed.) **The comprehensive sourcebook of bacterial protein toxins**. EUA: San Diego, p. 589-610, 1999.

MONTELES, J. S. et al. Percepção socio-ambiental das marisqueiras no município de Raposa, Maranhão, Brasil. **Revista Brasileira de Engenharia de Pesca**, v. 4, p. 34-45, 2009.

MPA. Ministério da Pesca e Aquicultura. **Boletim estatístico da pesca e aquicultura - Brasil**. 2010. 128 p.

MPA. Ministério da Pesca e Aquicultura. 2011. Disponível em: <<http://www.mpa.gov.br/index.php/pescampa/artesanal>> Acesso em: 23/11/12.

MURRAY, R.J. Recognition and management of *Staphylococcus aureus* toxin-mediated disease. **Internal Medicine Journal**, v. 2, S106–S119, 2005.

NARCHI, W. Aspectos ecológicos e adaptativos de alguns bivalves do litoral paulista. **Papéis Avulsos de Zoologia**, v. 27, p. 235-262, 1974.

NORMANNO, G. et al. Coagulase-positive Staphylococci and *Staphylococcus aureus* in food products marketed in Italy. **International Journal of Food Microbiology**, v.98, p. 73-79, 2005.

NOTERMANS, S.; HEUVELMAN, K.J.; WERNSRDS, K. Synthetic enterotoxin B DNA probes for detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* strains. **Applied Environmental Microbiology**, v. 54, p. 531-533, 1988.

NOVICK, R.R. et al. Synthesis of staphylococcal virulence factors is controlled by a regulatory RNA molecule. **EMBO Journal**, v. 12, p. 3967-3975, 1993.

ORDEN, J.A.; GOYACHE, J.; HERNANDEZ, J. Production of staphylococcal enterotoxins and TSST-1 by coagulase negative staphylococci isolate from ruminant mastitis. **Journal of Veterinary Medicine**, v.39, p.144-148, 1992.

OSTYN, A. et al. First evidence of a food poisoning outbreak due to staphylococcal enterotoxin type E, France, 2009. **Euro Surveillance**, v.13, p. 19528, 2010.

OTERO, A. et al. Production of staphylococcal enterotoxins C1 and C2 and thermonuclease throughout the growth cycle. **Applied Environmental Microbiology**, v. 56, p. 555–559, 1990.

PARK, C.E.; AKTAR, M.; RAYMAN, K. Nonspecific reactions of a commercial enzyme-linked immunoabsorbent assay kit (Tecra) for detection of Staphylococcal enterotoxins in foods. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, p. 2509-2512, 1992.

PEDROSA, L.F.C.; COZZOLINO, S.M.F. Composição centesimal e de minerais de mariscos crus e cozidos da cidade de Natal/RN. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, p. 154-157, 2001.

PEREIRA, M.A. et al. Estafilococos: Até onde sua importância em alimentos? **Higiene alimentar**, v.14, p.32-39, 2000.

PEREIRA, N. C. **Diagnóstico ambiental da Lagoa da Conceição, utilizando-se o berbigão, *Anolamocardia brasiliiana* (Gmelin, 1791) como bioindicador de poluição aquática, através da análise bioquímica do estresse oxidativo**. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil, 2003.

PEREIRA, M.A. et al. Microbiological quality of oysters (*Crassostrea Gigas*) produced and commercialized in the coastal region of Florianópolis – Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 159-163, 2006.

PEREIRA, M. M. D. et al. Utilização da análise de coliformes como indicativo de sanidade dos mexilhões *Perna perna* (Linnaeus, 1758) cultivados na ilha Guafba, Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 16, p.95-99, 2009.

PINCHUK, I.V.; BESWICK, E.J.; REYES, V.E. Staphylococcal enterotoxins. **Toxins**, v. 2, p. 2177–2197, 2010.

PLANO L. R. W. et al. 2011. Shedding of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from adult and pediatric bathers in marine waters. **BMC Microbiology**, v. 11, doi:10.1186/1471-2180-11-5, 2011.

PRINS, T.C.; ESCARAVAGE, V. Can bivalve suspension-feeders affect pelagic food web structure? **NATO Science Series IV: Earth and Environmental Series**, v. 47, p. 31-51, 2005.

RIOS, E. C. **Seashells of Brazil**. Rio grande, RS: Editora da Fundação Universidade do Rio Grande, 2º ed., 492p. 1994.

RIPPEY, S.R. Infectious Diseases Associated with Molluscan Shellfish Consumption. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 7, p. 419-425, 1994.

RODRIGUES, A. M. L.; BORGES - AZEVEDO, C. M; HENRY - SILVA, G. G. Aspectos da biologia e ecologia do molusco bivalve *Anomalocardia brasiliiana* (Gmelin, 1791) (Bivalvia, Verenidae). **Revista Brasileira de Biociência**, v. 8, p. 377-383, 2010.

ROSEC, J. P.; GIGAUD, O. Staphylococcal enterotoxin genes of classical and new types detected by PCR in France. **International Journal of Food Microbiology**, v. 77, p. 61-70, 2002.

RUPPERT, E.; BARNES, R.D. **Zoologia dos Invertebrados**. Roca Ed., São Paulo, 6ª ed., 1029 p., 1996.

SANTANA, E.H.W. et al. Staphylococci: colonies morphological characteristics, coagulase and EEA production collected from cooled raw Milk samples. **SEMINA: Ciências Agrárias**, v.27, p. 639-646, 2006.

SANTANA, E.H.W. et al. Estafilococos em alimentos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 77, p. 545-554, 2010.

SCHWALBE, R.S. Emergence of vancomycin resistance in coagulase-negative staphylococci. **New England Journal of Medicine**, v. 316, p. 925-930, 1987.

SILVA, W.P. et al. Biochemical characteristics of typical and atypical *Staphylococcus aureus* in mastitic Milk and environmental sample of brazilian dairy farms. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.3, p. 103-106, 2000.

SMITH, D.C.; BARLOW K. Outbreak alert!: Center for Sciences in Public Interest (CSPI), Washington, 48p., 2001. Disponível em: http://www.cspinet.org/reports/outbreak_report.pdf.

SOGE O.O. et al. Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant coagulase-negative *Staphylococcus* spp. isolated from US west coast public marine beaches. **Journal of Antimicrobial and Chemotherapy**, v. 64, p.1148–1155, 2009.

STAMFORD, T.L.M. et al. Enterotoxidade de *Staphylococcus* spp. isolados de leite *in natura*. **Revista de Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 26, 2006.

SU, Y.C.; WONG, A.C.L. Current perspectives on detection of staphylococcal enterotoxins. **Journal of Food Protection**, v.60, p. 195-202, 1997.

TAN, T.Y.; NG, S.Y.; NG, W.X. Clinical significance of coagulase negative staphylococci recovered from nonsterile sites. **Journal Clinical Microbiology**, v. 44, p. 3413-4, 2006.

TENOVER, F.C. et al. Vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* isolate from a patient in Pennsylvania. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, p. 275-80, 2004.

TOKUE, Y. et al. Comparison of a Polymerase Chain Reaction Assay and a Conventional Microbiologic Method for Detection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 36, p. 6-9, 1992.

TOMASZ, A. et al. New mechanism for methicillin-resistance in *S. aureus*: clinical isolates that lack the PBP2a gene and contain normal penicillin-binding proteins with modified penicillin-binding capacity. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 33, p.1869-1874, 1989.

TROTTE, A. et al. Importance of heterotrophic planktonic communities in a mussel culture environment: the Grande Entrée lagoon, Magdalen Islands (Quebec, Canada). **Marine Biology**, v.151, p. 377-392, 2007.

TURLEJ, A.; HRYNIEWICZ, W.; EMPEL, J. Staphylococcal cassette chromosome mec (Sccmec) classification and typing methods: an overview. **Polish Journal of Microbiology**, v. 60, p. 95-103, 2011.

UDO, E.E. Enterotoxin production by coagulase-negative staphylococci in restaurant workers from Kuwait City may be a potential cause of food poisoning. **Journal of Medical Microbiology**, v. 48, p. 819-23, 1999.

VÁZQUEZ-SÁNCHEZ, D. et al. Incidence and characterization of *Staphylococcus aureus* in fishery products marketed in Galicia (Northwest Spain). **International Journal of Food Microbiology**, v. 157, p. 286-296, 2012.

VERAS, J.F.; CARMO, L.S.; TONG, L.C. A study of the enterotoxigenicity of coagulase negative and coagulase-positive staphylococcal isolates from food poisoning outbreaks in Minas Gerais, Brazil. **International Journal of Infectious Diseases**, v.12, p. 410-415, 2008.

VERNOZY, R.C. et al. Enterotoxin production by coagulase-negative staphylococci isolated from goats milk and cheeses. **International Journal of Food Microbiology**, v. 30, p. 271-280, 1996.

VERSCHUERE, L. et al. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, p. 655-671, 2000.

VOLADRI R.K.; KERNODLE D.S. Characterization of a chromosomal gene encoding type B β -lactamase in phage group II isolates of *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, p. 3163-8, 1998.

VON EIFF, E.C. et al. Nasal Carriage As a Source of *Staphylococcus aureus* Bacteremia. Study Group. **New England Journal Medicine**, v. 344, p. 11-16, 2001.

XU, B. et al. A Multiplex PCR Assay for the Rapid and Sensitive Detection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and Simultaneous Discrimination of *Staphylococcus aureus* from Coagulase-Negative Staphylococci. **Journal of Food Science**, v. 77, M638-M642, 2012.

ZAREI, M; MAKTABI, S.; GHORBANPOUR. Prevalence of *Listeria monocytogenes*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Staphylococcus aureus*, and *Salmonella* spp. in Seafood Products Using Multiplex Polymerase Chain Reaction. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 9, p. 108-112, 2012.

WANG, X. et al. Antimicrobial Susceptibility Testing and Genotypic Characterization of *Staphylococcus aureus* from Food and Food Animals. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 9, p. 95-101, 2012.

WARD, E.J.; SHUMWAY, S.E. Separating the grain from the chaff: particle selection in suspension- and deposit-feeding bivalves. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 300, p. 83-130, 2004.

WONG, A.C.L.; BERGDOLL, M.S. **Staphylococcal food poisoning**. 2^o ed., London: Elsevier, p. 231-248, 2002.

5. MANUSCRITO

Caracterização fenotípica e genotípica de *Staphylococcus* coagulase-negativos resistentes à meticilina isolados do molusco bivalve *Anomalocardia brasiliiana* (GMELIN, 1791)

Jacqueline Ellen Camelo Batista ¹, Ewerton Lucena Ferreira ², Danielle Cristina de Oliveira Nascimento ¹, Roberta Ferreira Ventura ¹, Wagner Luis Mendes de Oliveira ², Nilma Cintra Leal ², José Vitor Lima-Filho ^{1*}

¹ Laboratório de Microbiologia e Imunologia, Departamento de Biologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife-PE – Brasil;

² Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Laboratório de Microbiologia, Fundação Oswaldo Cruz (CPqAM/FIOCRUZ), Recife-PE – Brasil;

* Departamento de Biologia, Laboratório de Microbiologia e Imunologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, R. Dom Manoel de Medeiros s/n, Campus Dois Irmãos, Recife, Pernambuco, CEP 52171-900, Brasil. E-mail: jvitor@db.ufrpe.br - Tel: + 55 31 81 3320.6312 - Fax: + 55 31 81 3320.6300.

Artigo submetido para a revista Foodborne Pathogens and Disease. ISSN: 1535-3141. Fator de Impacto JCR (2011): 2.260; QUALIS B1 na área de Medicina Veterinária.

Resumo

No presente estudo, foi realizada a caracterização molecular dos genes das enterotoxinas e do gene *mecA* de *Staphylococcus* coagulase-negativos resistentes à meticilina isolados da carne do molusco bivalve *A. brasiliana* (n=30). Isolados de amostras *in natura* (n=9) foram identificados como *S. xylosus* (4/9), *S. cohnii* spp. *urealyticus* (4/9) e *S. sciuri* (1/9). Dentre amostras comercializadas (n=21), foram identificados *S. sciuri* (16/21), *S. xylosus* (4/21) e *S. lentus* (1/21). A determinação do perfil de sensibilidade a antibióticos foi realizada seguindo orientações do CLSI. Os maiores índices de resistência foram observados em isolados de amostras *in natura* contra eritromicina (58,53%), penicilina (51,21%) e tetraciclina (43,9%). Isolados de amostras comercializadas apresentaram maior percentual de resistência à oxacilina (55,3%) e penicilina (36,8%). Todas as espécies coagulase-negativas resistentes à oxacilina e/ou cefoxitina foram positivas para a presença do gene *mecA*, mas sensíveis fenotipicamente à vancomicina. Ainda, os genes das enterotoxinas *seg* e *seh* foram detectados em 77,7 % e 88,8% dos isolados de amostras ambientais, contra 90,5% e 100% dos isolados de amostras comercializadas, respectivamente. Os resultados obtidos no presente trabalho revelam a presença de *Staphylococcus* coagulase-negativos portadores do gene de resistência à meticilina. Além disso, tais espécies apresentaram elevado percentual de genes toxigênicos (*seg* e *seh*). Este é primeiro relato de *Staphylococcus* coagulase-negativos resistentes à meticilina no molusco bivalve *A. brasiliana*.

Palavras-chave: *mecA*, *Staphylococcus* coagulase-negativos, enterotoxinas.

Introdução

Espécies de *Staphylococcus*, particularmente as que possuem resistência à meticilina, são capazes de produzir enterotoxinas (Hu et al., 2008). A ingestão de enterotoxinas estafilocócicas no alimento é capaz de causar intoxicação, resultando em episódios de vômito, náusea e diarreia, acompanhados ou não de dores abdominais (Le Loir et al., 2003). Dentre as 22 enterotoxinas descritas até o momento, SEA, SEB, SEC, SED e SEE são consideradas os tipos clássicos e têm sido relatada em produtos lácteos, bolos, carne e ovos (Argudín et al., 2010). A presença de genes enterotoxigênicos tem sido relatada em espécies de *Staphylococcus* coagulase-negativas (Unal; Cinar, 2012). Além disso, estudo realizado por Breckinridge; Bergdoll, (1971) mostrou que cepas coagulase-negativas foram capazes de causar surtos de intoxicação alimentar.

Outra característica de importância para a saúde pública associada as espécies de *Staphylococcus* coagulase-negativos é a resistência aos antimicrobianos no ambiente hospitalar (Jonh; Harvin, 2007), apresentando alto índice de resistência à oxacilina (>70%) em todo o mundo (Diekema et al., 2001). No entanto, dados associando a presença de *Staphylococcus* coagulase-negativos resistentes à meticilina no ambiente comunitário são escassos (Barbier et al., 2010).

A resistência à meticilina é mediada pelo gene *mecA* que está presente no cassete cromossômico móvel *mec* (SCC*mec*) e codifica a proteína PBP2a, conferindo resistência à meticilina e vários antibióticos beta-lactâmicos (Kondo et al., 2007). Geralmente os isolados que possuem SCC*mec* do tipo IV possuem origem comunitária (CA-MRSA) (Rossney et al., 2007). Hassen et al. (2004) indicaram evidências de transferência horizontal de SCC*mec* entre *Staphylococcus* coagulase-negativos resistentes à meticilina e cepas de *S. aureus* resistentes à meticilina. A integração e a excisão do SCC*mec* em loci genômicos específicos (SCC*mec* *attachment site* - att*B**scc*) é realizado por recombinases *ccr*, permitindo sua transferência horizontal intra e interespecies (Ito et al., 1999; Gordon; Lowy, 2008).

No Brasil, a produção de pescado atingiu cerca de 1.264.765 t em 2010 (MPA, 2010). Nesse contexto, a região nordeste foi a maior produtora, com 410.532 t, representando 32,5% da produção nacional (MPA, 2010). Os recursos pesqueiros marinhos e estuarinos são importantes para o desenvolvimento econômico e meio de subsistência das comunidades de pescadores locais. Dentre as diversas espécies de moluscos marinhos explorados na região, *Anomalocardia brasiliiana* se destaca com sua carne comercializada na área metropolitana dos grandes centros urbanos.

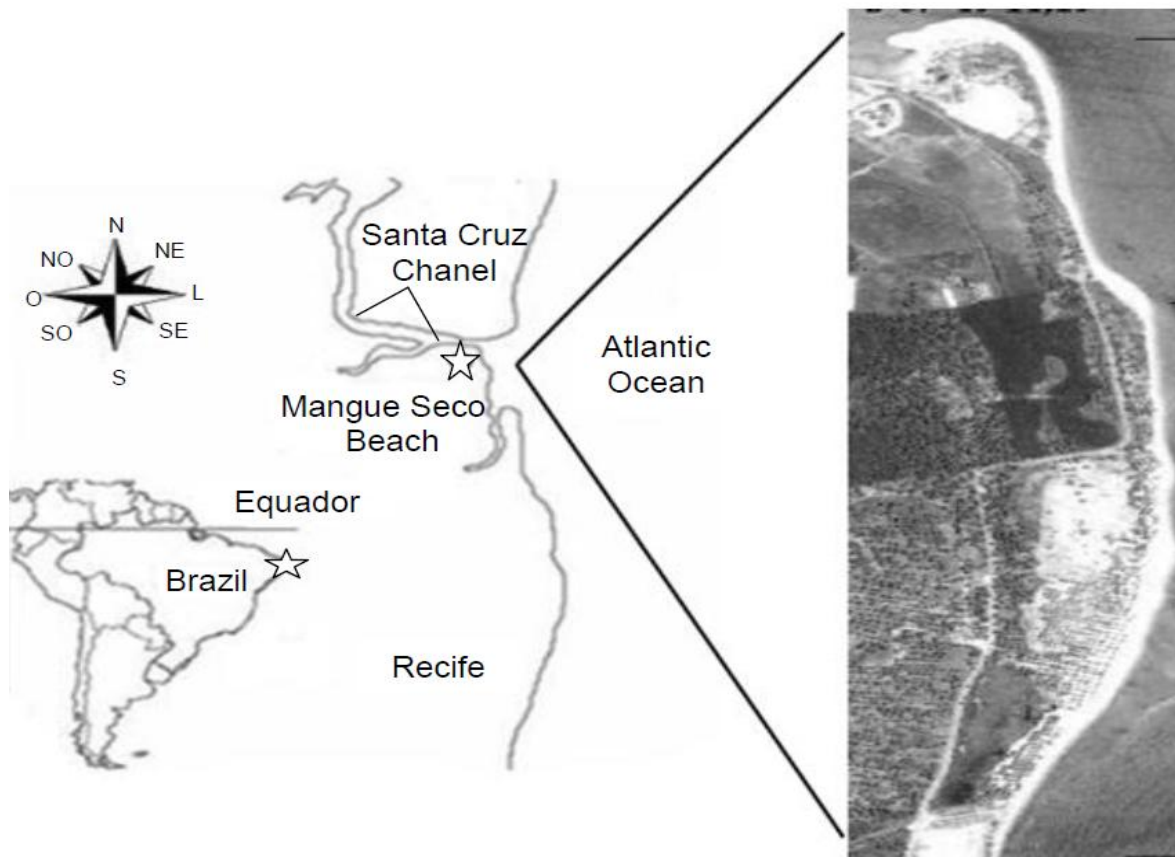
No presente trabalho, *Staphylococcus* coagulase-negativos resistentes à meticilina isolados do molusco bivalve *A. brasiliiana* foram identificados em amostras ambientais e comercializadas e caracterizados com relação à presença do gene *mecA* e dos genes das enterotoxinas.

Material e Métodos

Obtenção das amostras

As amostras *in natura* do molusco *A. brasiliiana* foram obtidas na Praia de Mangue Seco (07°50'03"S, 34°54'21"W), localizada no litoral norte de Pernambuco (Figura 3). As amostras (n=48) foram coletadas no período de abril a junho de 2009. As amostras comercializadas foram analisadas em triplicatas e obtidas em estabelecimentos na Região Metropolitana do Recife, Pernambuco, Brasil (n=33), entre os meses de janeiro a março de 2012. Após a coleta, todas as amostras foram acondicionadas em caixas isotérmicas contendo gelo reciclável para o transporte ao laboratório e posterior análise.

Figura 3: Localização da área de estudo na Praia de Mangue Seco\Igarassu-PE.



Isolamento e identificação dos *Staphylococcus* spp.

A partir de 25g da carne do molusco, foram realizadas diluições seriadas em solução salina peptonada estéril a 0,1%, que variaram de 10^{-1} a 10^{-3} . De cada diluição, uma alíquota de 0,1mL foi semeada em Ágar Manitol (Oxoid). As colônias fermentadoras do manitol foram submetidas à coloração de Gram e triagem bioquímica através da prova da catalase e prova da oxidação e fermentação da glicose. Após a identificação no nível de gênero, todos os isolados foram caracterizados com relação à presença da enzima coagulase. Isolados coagulase-negativos resistentes à oxacilina e/ou cefoxitina foram submetidos a identificação no nível de espécie utilizando o sistema de identificação comercial API Staph (Biomerieux).

Teste da susceptibilidade aos antimicrobianos

A susceptibilidade dos isolados aos antimicrobianos foi testada utilizando o método de disco difusão em agar, de acordo com instruções do documento M100-S22 do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012). Foram testados os seguintes antimicrobianos (Laborclin, Brasil): penicilina [10 un], oxacilina [1 µg], cefoxitina [30 µg], gentamicina [10 µg], eritromicina [15 µg], tetraciclina [30 µg], ciprofloxacina [5 µg], levofloxacina [5 µg], clorafenicol [30 µg], clindamicina [2 µg] e rifampicina [5 µg]. Todos os testes foram realizados em duplicata, sendo utilizada para controle de qualidade a cepa padrão *S. aureus* ATCC nº 25923. A multirresistência foi definida como a resistência a três ou mais classes de antibióticos (Magiorakos et al., 2012).

Teste da microdiluição em caldo

A susceptibilidade dos isolados à vancomicina (Sigma) foi testada em microplacas de 96 poços (CLSI, 2003) e classificada de acordo com os valores de MIC estabelecidos pelo CLSI (CLSI, 2012). As análises foram realizadas em duplicata, sendo utilizada para controle de qualidade a cepa padrão *S. aureus* ATCC nº 25923.

Detecção do gene *mecA*

Para análise molecular, colônias individuais foram crescidas em caldo BHI (Brain Heart Infusion, Oxoid) por 24 horas a 37°C. A partir deste crescimento foi extraído o DNA total conforme descrito por Freitas et al. (2008), utilizando o método tradicional de extração com fenol. Após a extração, o DNA foi suspenso em 10 µl de solução RNase (10 mg mL⁻¹), quantificado no espectrofotômetro NanoDrop 2000c (Thermo Scientific, USA) e armazenado a 20 °C. A detecção do gene *mecA* foi realizada através de reação em cadeia da polimerase (PCR) com os primers descritos por Kondo et al. (2007). As reações foram preparadas para um volume final de 25 µL contendo 20 ng de DNA, 2.5 µL de tampão Gree Go Taq (Promega), 200 µmol l⁻¹

de cada dNTP, 1.5 mM de MgCl₂, 10 µmol de cada primer e 1U de Go Taq polymerase (Promega). Foi utilizado o termociclador (Biometra) programado para 30 ciclos de 94°C por 1 min, 55°C por 1 min, 72°C por 1 min, seguido por 72°C por 7 min. Uma alíquota de 5µL do produto amplificado foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1% com brometo de etídio, visualizado em transluminador UV e digitalizado usando o software KODAK 1D versão 3.5.2 (Scientific Imaging Systems, USA). Para o controle positivo da reação foi utilizada a cepa padrão ATCC n° 33591.

Detecção dos genes das enterotoxinas estafilocócicas

Os primers utilizados para detecção das enterotoxinas clássicas estão descritos por Becker et al. (1998). Foi realizada PCR-multiplex para os genes *sea*, *seb*, *sec*, *sed* e *see*. As reações foram preparadas para um volume final de 25 µL contendo 20 ng de DNA, 2.5 µL de tampão Gree Go Taq (Promega), 200 µmol l⁻¹ de cada dNTP, 1.5 mM de MgCl₂, 10 pmol de cada primer e 1U de Go Taq polymerase (Promega). A programação no termociclador consistiu em 30 ciclos de 95°C por 1 min, 60°C por 1 min, 72°C por 2 min, seguido por 72°C por 5 min. Para o controle da especificidade da reação foram utilizadas as cepas padrão de *S. aureus* FRI 722 (Food Research Institute, Madison, USA) para o gene *sea*, FRI S6 para o gene *seb*, FRI 361 para o gene *sec* e FRI 1151 para o gene *sed*. A pesquisa dos genes *seg* e *seh* foi realizada através de PCR simples usando os primers descritos por Rosec; Gigaud (2002). As reações foram preparadas para um volume final de 25 µL contendo 20 ng de DNA, 2.5 µL de tampão Gree Go Taq (Promega), 200 µmol l⁻¹ de cada dNTP, 1.5 mM de MgCl₂, 20 pmol de cada primer e 1U de Go Taq polymerase (Promega). As cepas padrões de *S. aureus* FRI 361 e CR6 foram usadas como controles para os genes *seg* e *seh*, respectivamente. Os produtos de amplificação (*amplicons*) foram separados através de eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio, visualizados em transluminador UV.

Sequenciamento

Para confirmação dos segmentos amplificados, dois *amplicons* de cada gene avaliado foram selecionados e purificados com ExoSAP-IT (USB Corporation, EUA), conforme instruções do fabricante e sequenciados. As sequências obtidas foram alinhadas utilizando o programa Mega, versão 5 (Tamura et al., 2011). Foi analisada a similaridade dessas sequências com sequências de referência, depositadas no banco de dados do NCBI, através do programa BLAST – *Basic Local Alignment Search Tool* (Altschul et al., 1997).

Resultados

Foram identificados 79 isolados de estafilococos obtidos de amostras *in natura* (n=41) e comercializadas (n=38), sendo todos coagulase-negativos. De maneira geral, foi encontrado elevado percentual de resistência nos isolados de amostras *in natura*, estando os maiores índices associados à eritromicina (58,5%), penicilina (51,2%) e tetraciclina (43,9%). Tais isolados apresentaram sensibilidade à cefoxitina (100%), gentamicina (100%) e baixa resistência à oxacilina (Tabela 1). Já os isolados de amostras comercializadas apresentaram maior percentual de resistência à oxacilina (55,3%) e penicilina (36,8%) e alto percentual de sensibilidade aos demais antibióticos testados (Tabela 2). Todas as cepas foram sensíveis à vancomicina. A multirresistência foi encontrada em 41,4% dos isolados de amostras *in natura* e apenas 5,3% dos isolados de amostras comercializadas.

Os isolados que apresentaram resistência no teste fenotípico à oxacilina e/ou cefoxitina (n=30) foram identificados no nível de espécie e submetidos à caracterização molecular. A porcentagem de identificação dos isolados utilizando o sistema comercial API Staph variou de 84,9% a 99,9% nas amostras ambientais e 51,7% a 99,9% nas amostras comercializadas. Os estafilococos isolados de amostras *in natura* (n=9) foram *Staphylococcus xylosus* (4/9), *Staphylococcus cohnii* spp. *urealyticus* (4/9) e *Staphylococcus sciuri* (1/9) (Tabela 3). Dentre as espécies isoladas da carne do molusco comercializada (n=21), a mais prevalente foi

Staphylococcus sciuri (16/21), seguida de *Staphylococcus xylosus* (4/21) e *Staphylococcus lentus* (1/21) (Tabela 4).

Independentemente da espécie, todos os isolados (n=30) resistentes à oxacilina e/ou cefoxitina foram positivos para a presença do gene *mecA* e negativos para o teste da coagulase (Figura 4). Em relação aos genes das enterotoxinas, somente foram detectados os genes *sea*, *seb*, *sec*, *sed* e *see* nas cepas de *Staphylococcus* utilizadas como referência. Foi observado que os genes *seg* e *seh* foram detectados em 77,7 % e 88,8% dos isolados de amostras ambientais contra 90,5% e 100% dos isolados de amostras comercializadas, respectivamente.

Discussão

Dentre as amostras do molusco comercializadas, a espécie *S. sciuri* foi a mais frequentemente isolada. De acordo com Huber et al. (2011), tal espécie tem sido caracterizada como portadora natural de um homólogo que possui 88% de equivalência ao gene *mecA* presente em *S. aureus* (Wu et al., 1996). Diante disso, existe a hipótese de que o *mecA* presente em MRSA teria sido adquirido de seu ancestral evolutivo *S. sciuri*. Pesquisa realizada por Couto et al. (2000) sugeriu que essa espécie pode acumular marcadores de resistência para várias classes de antibióticos. Assim, a espécie *S. sciuri* isolada da carne de *A. brasiliiana* pode ser importante fonte de genes de resistência.

Em relação às amostras ambientais de *A. brasiliiana*, as espécies *S. xylosus* e *S. cohnii* spp. *urealyticus* foram as mais isoladas. Contudo, de maneira geral, ambas amostras ambientais e comercializadas apresentaram espécies coagulase-negativas resistentes aos antimicrobianos testados. A multirresistência à antimicrobianos de várias classes tem sido comumente descrita em *Staphylococcus* coagulase-negativos (Bhargava; Zhang, 2012). No presente estudo, foram detectados níveis elevados de resistência à antibióticos não beta-lactâmicos, como a eritromicina, ciprofloxacino, levofloxacino e tetraciclina. Esse fato é preocupante, considerando as opções limitadas no tratamento de infecções causadas por cepas multirresistentes.

As espécies coagulase-negativas com fenótipo de multirresistência identificadas nessa pesquisa são raramente associadas à infecções humanas hospitalares e comunitárias. No entanto, podem oferecer risco potencial de transmissão de genes de resistência por transferência horizontal para espécies patogênicas como *Staphylococcus aureus*, responsável por uma série de infecções que acomete o homem (Bhargava; Zhang et al., 2012).

Para prever a resistência à meticilina dentre estafilococos coagulase-negativos, o CLSI atualmente recomenda que os testes de disco-difusão sejam realizados com o antibiótico cefoxitina em substituição à oxacilina (CLSI, 2012). Apesar disso, nossos resultados mostraram que a oxacilina foi mais sensível para prever o gene *mecA* e resistência à meticilina, já que os 30 (100%) isolados resistentes foram *mecA* positivos, e destes, apenas 4 (13,3%) foram resistentes à cefoxitina. Assim, o teste utilizando a cefoxitina pode não refletir corretamente a resistência fenotípica de *Staphylococcus* coagulase-negativos, o que também tem sido observado por outros autores (Frigatto et al., 2005; Hung et al., 2011). Portanto, a PCR para detecção do gene *mecA* é atualmente considerada “padrão ouro” para identificação de cepas MRSA (Tokue et al., 1992).

Interessantemente, a detecção de cepas multirresistentes foi mais frequente entre os isolados de amostras *in natura* (41,4%), quando comparadas às cepas isoladas de amostras comercializadas (5,3%). Tal resultado foi correlacionado com o tratamento térmico utilizado para o desconchamento de *A. brasiliensis* comercializada pelas comunidades locais de pescadores, o que pode ter repercutido no menor índice de cepas multirresistentes nessas amostras. Por outro lado, a contaminação nas amostras ambientais parece refletir o estado microbiológico das águas nos locais de coleta na praia de Mangue Seco.

As espécies coagulase-negativas identificadas no presente trabalho, *S. sciuri*, *S. cohnii*, *S. xylosus* e *S. lentus* foram relatadas na literatura como produtoras de enterotoxinas (Bautista et al., 1988; Valle et al., 1990; Rodriguez et al., 1996; Vernozy et al., 1996; Udo et al. 1999). Tal fato é de grande relevância, considerando o estudo recente realizado por Podkowik et al. (2013)

que forneceu evidências e relatou a importância de *Staphylococcus* coagulase-negativos como potenciais produtores de enterotoxinas e causadores de intoxicação alimentar. Particularmente, as enterotoxinas SEG e SEH tem sido identificadas em estafilococos de diferentes fontes causando surtos de intoxicação alimentar (Pereira et al., 1996; Omoe et al., 2002; Ikeda et al., 2005; Jorgensen et al., 2005). No presente estudo, a maioria dos isolados apresentou os genes *seg* e *seh*, cujas enterotoxinas produzem doença emética. Estudo realizado por Hu et al., 2011 sugeriu que existe uma associação entre o elemento genético móvel SCCmec com os genes das enterotoxinas e que tal coexistência parece contribuir para a patogenicidade dos isolados. Considerando que a maioria dos isolados portadores do gene *mecA*, presente no SCCmec, foram positivos para pelo menos um gene enterotoxigênico, nossos resultados corroboram com tal evidência.

Conclusão

Os dados obtidos revelaram a presença de genes relacionados à produção de enterotoxinas em *Staphylococcus* coagulase-negativos resistentes à meticilina isolados do molusco bivalve *A. brasiliana*. Esse é o primeiro relato de *Staphylococcus* coagulase-negativos resistentes à meticilina no molusco bivalve *A. brasiliana*.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) pelo financiamento do projeto e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida ao primeiro autor. Agradecem também ao Laboratório de Microbiologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM/FIOCRUZ-PE) e ao Programa PDTIS-Fiocruz pelo apoio dado às análises moleculares.

Referências

Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucl Acids Res* 1997; 25:3389-3402.

Argudín MA, Mendoza MC, Rodicio MR. Food Poisoning and *Staphylococcus aureus* Enterotoxins. *Toxins* 2010; 2:1751-1773.

Bhargava K and Zhang Y. Multidrug-resistant Coagulase-negative Staphylococci (CoNS) in Food Animals. *J Appl Microbiol* 2012; 113:1027-36.

Barbier F, Ruppé E, Hernandez D, Lebeaux D, Francois P, Felix B, Desprez A, Maiga A, Woerther PL, Gaillard K, Jeanrot C, Wolff M, Schrenzel J, Andremont A, Ruimy R. Methicillin-Resistant Coagulase-Negative Staphylococci in the Community: High Homology of SCCmec IVa between *Staphylococcus epidermidis* and Major Clones of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis* 2010; 202:270-281.

Bautista L, Gaya P, Medina M, Nuñez M. A quantitative study of enterotoxin production by sheep milk staphylococci. *Appl Environ Microbiol* 1988; 54:566-569.

Becker K, Roth R, Peters G. Rapid and specific detection of toxigenic *Staphylococcus aureus*: Use of two multiplex PCR enzyme immunoassay for amplification and hybridization of staphylococcal enterotoxin genes, exfoliative toxin genes, and toxic shock syndrome toxin 1 gene. *J Clin Microbiol* 1998; 36:2548-2553.

Breckinridge JC and Bergdoll MS. Outbreak of Food-Borne Gastroenteritis Due to a Coagulase-Negative Enterotoxin-Producing *Staphylococcus*. N Engl J Med 1971; 284:541-543.

[CLSI] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-Second Informational Supplement. CLSI Document M100-S22. Wayne, PA: CLSI, 2012.

[CLSI] Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Dilution Susceptibility. Tests for Bacteria That Grow Aerobically: Approved Standard – Sixth Edition. CLSI Document M7-A6. Wayne, PA: CLSI, 2003.

Couto I, Sanches IS, Sá-Leão R, de Lencastre H. Molecular Characterization of *Staphylococcus sciuri* Strains Isolated from Humans. J Clin Microbiol 2000; 38:1136-1143.

Diekema DJ, Pfaller MA, Schmitz FJ, Smayevsky J, Bell J, Jones RN, Beach M, SENTRY Participants Group. Survey of infections due to *Staphylococcus* species: Frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pacific Region for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997–1999. Clin Infect Dis 2001; 15:S114-S1132.

Freitas MFL, Luz IS, Silveira-Filho VM, Júnior JWP, Stamford TLM, Mota RA, Sena MJ, Almeida AMP, Balbino VQ, Leal-Balbino, TC. Staphylococcal toxin genes in strains isolated from cows with subclinical mastitis. Pesq Vet Bras 2008; 28:617-621.

Frigatto EAM, Machado AMO, Pignatari ACC, Gales AC. Is the ceftiofur disk test reliable enough to detect oxacillin resistance in coagulase-negative Staphylococci? J Clin Microbiol

2005; 43:2028-2029.

Hanssen AM, Kjeldsen G, Sollid JUE. Local Variants of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* in Sporadic Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and Methicillin-Resistant Coagulase-Negative Staphylococci: Evidence of Horizontal Gene Transfer? *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48:285-296.

Hu DL, Omoe K, Inoue F, Kasai T, Yasujima M, Shinagawa K, Nakane A. Comparative prevalence of superantigenic toxin genes in methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* isolates. *J Med Microbiol* 2008; 57:1106-1112.

Hu DL, Maina EK, Omoe K, Inoue F, Yasujima K, Nakane A. Superantigenic toxin genes coexist with specific staphylococcal cassette chromosome *mec* genes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Exp Med.* 2011; 225:161-169.

Huber H, Ziegler D, Pfluger V, Vogel G, Zweifel C, Stephan R. Prevalence and characteristics of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci from livestock, chicken carcasses, bulk tank milk, minced meat, and contact persons. *BMC Vet Res* 2011; 7:6.

Hung KH, Yan JJ, Chen HM. Evaluation of discrepancies between oxacillin and cefoxitin susceptibility in coagulase-negative staphylococci. *J Clin Microbiol Infect Dis* 2011; 30:785-788.

Ikeda TN, Tamate K, Yamaguchi, Makino S. Mass outbreak of food poisoning disease caused by small amounts of staphylococcal enterotoxins A and H. *Appl Environ Microbiol* 2005; 71:2793–2795.

Ito T, Katayama, Y, Hiramatsu K. Cloning and nucleotide sequence determination of the entire *mec* DNA of pre-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* N315. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43:1449-1458.

Jonh JF, Harvin, AM. History and evolution of antibiotic resistance in coagulase-negative staphylococci: Susceptibility profiles of new anti-staphylococcal agents. *Ther Clin Risk Manag* 2007; 3:1143–1152.

Jorgensen HJT, Mathisen A, Lovseth K, Omoe KS, Qvale, Loncarevic S. An outbreak of staphylococcal food poisoning caused by enterotoxin H in mashed potato made with raw milk. *FEMS Microbiol* 2005; 252:267-272.

Kondo Y, Ito T, Ma XX, Watanabe S, Kreiswirth BN, Etienne J, Hiramatsu K. Combination of Multiplex PCRs for Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* Type Assignment: Rapid Identification System for *mec*, *ccr*, and Major Differences in Junkyard Regions. *Antimicrob Agents Ch* 2007; 51:264-274.

Le Loir Y, Baron F, Gautier, M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genet Mol Res* 2003; 2:63-76.

Gordon RJ and Lowy FD. Pathogenesis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Clin Infect Dis* 2008; 46:S350–S359.

Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske S, Harbarth S, Hindler JF, Kahlmeter G, Olsson-Liljequist B, Paterson DL, Rice LB, Stelling J, Struelens MJ, Vatopoulos A, Weber JT, Monnet DL. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect* 2012; 18:268-281.

[MPA] Ministério da Pesca e Aquicultura. Boletim estatístico da pesca e aquicultura - Brasil. MPA, 2010.

Omoe K, Machiko I, Shimoda Y, Hu DL, Ueda S, Shinagawa K. Detection of *seg*, *seh* and *sei* genes in *Staphylococcus aureus* isolates and determination of the enterotoxin productivities of *S. aureus* isolates harboring *seg*, *seh* ou *sei* genes. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 857-862.

Pereira,ML, Do Carmo LS, Dos Santos EJ, Pereira JL, Bergdoll MS. Enterotoxin H in Staphylococcal Food Poisoning. *J Food Prot* 1996; 59:559-561.

Podkowik M, Park JY, Seo KS, Bystrón J, Bania J. Enterotoxigenic potential of coagulase-negative staphylococci. *Int J Food Microbiol* 2013; Available online.

Rodriguez M, Nuñez F, Córdoba JJ, Bermúdez E, Asensio MA. Gram-positive, catalase-positive cocci from dry cured Iberian ham and their enterotoxigenic potential. *Appl Environ Microbiol* 1996; 62:1897-1902.

Rosec JP and Gigaud O. Staphylococcal enterotoxin genes of classical and new types detected by PCR in France. *Int J Food Microbiol* 2002; 25: 61-67.

Rossney AS, Shore AC, Morgan PM, Fitzgibbon MM, O'Connell B, Coleman DC. The Emergence and Importation of Diverse Genotypes of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Harboring the Panton-Valentine Leukocidin Gene (*pvl*) Reveal that *pvl* Is a Poor Marker for Community-Acquired MRSA Strains in Ireland. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 2554–2563.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA 5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol Biol Evol* 2011; 28:2731-2739.

Tokue Y, Shoji S, Satoh K, Watanabe A, Motomyia M. Comparison of a Polymerase Chain Reaction Assay and a Conventional Microbiologic Method for Detection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents and Chemother* 1992; 209:1143-1146.

Unal N, Cinar OD. Detection of staphylococcal enterotoxin, methicillin-resistant and Pantone-Valentine leukocidin genes in coagulase-negative staphylococci isolated from cows and ewes with subclinical mastitis. *Trop Anim Health Pro* 2012; 44:369-375.

Udo EE, Al-Bustan MA, Jacob LE, Chugh TD. Enterotoxin production by coagulase-negative staphylococci in restaurant workers from Kuwait City may be a potential cause of food poisoning. *J Med Microbiol* 1999; 48:819-823.

Valle J, Gomez-Lucia E, Piriz S, Goyache J, Orden JA, Vadillo S. Enterotoxin Production by Staphylococci Isolated from Healthy Goats. *Appl Environ Microbiol* 1990; 56:1323-1326.

Vernozy RC, Mazuy C, Prevost G, Lapeyre C, Bes M, Brun Y, Fleurette J. Enterotoxin production by coagulase-negative staphylococci isolated from goats milk and cheese. *Int J Food Microbiol* 1996; 30:271-280.

Wu S, Piscitelli C, de Lencastre H, Tomasz A. Tracking the evolutionary origin of the methicillin resistance gene: cloning and sequencing of a homologue of *mecA* from a methicillin susceptible strain of *Staphylococcus sciuri*. *Microb Drug Resist* 1996; 2:435-441.

Tabela 1. Perfis de susceptibilidade aos antimicrobianos de *Staphylococcus* spp. isolados de amostras ambientais de *A. brasiliensis*. (Cont.)

Classe de antibiótico	Antibiótico	Conteúdo do disco (µg)	Intervalo de resistência (mm)	S %	I %	R %	Isolados resistentes
Penicilina	Penicilina	10 (un)	≤ 28	48,8	0	51,2	S3; S4; S5; S7; S8; S9; S10; S13; S16; S17; S18; S19; S21; S25; S26; S27; S28; S29; S30; S32; S34
	Oxacilina	1					
	Coagulase positivo		≤ 10	100	0	0	
	Coagulase negativo		≤ 17	78,1	0	21,9	S12; S15; S17; S19; S21; S26; S28; S35; S38
Cefalosporina	Cefoxitina	30					
	Coagulase positivo		≤ 21	100	0	0	
	Coagulase negativo		≤ 24	100	0	0	
Aminoglicosídeo	Gentamicina	10	≤ 12	100	0	0	
Fluoroquinolona	Ciprofloxacino	5	≤ 15	56,2	9,7	34,1	S11; S13; S14; S20; S21; S22; S23; S27; S28; S31; S37; S38; S40; S41
	Levofloxacino	5	≤ 15	53,7	7,3	39,0	S8; S11; S14; S20; S21; S22; S23; S26; S27; S28; S31; S34; S37; S38; S40; S41
Fenicol	Cloranfenicol	30	≤ 12	97,6	2,4	0	

Tabela 1. Perfis de susceptibilidade aos antimicrobianos de *Staphylococcus* spp. isolados de amostras ambientais de *A. brasiliensis*. (Conclusão)

Macrolídeo	Eritromicina	15	≤ 12	14,7	26,8	58,5	S4; S5; S7; S9; S10; S11; S12; S17; S20; S21; S22; S23; S26; S27; S28; S29; S30; S31; S32; S34; S36; S37; S38; S41
Lincosamida	Clindamicina	2	≤ 14	61,1	34,1	4,8	S17; S22
Tetraciclina	Tetraciclina	30	≤ 14	53,7	2,4	43,9	S8; S13; S14; S20; S21; S22; S23; S26; S27; S28; S29; S30; S31; S34; S37; S38; S40; S41
Ansamicina	Rifampicina	5	≤ 16	95,2	0	4,8	S13; S20

Porcentagem de sensibilidade (S); resistência intermediária (I); e resistência (R) do total de isolados.

Tabela 2. Perfis de susceptibilidade aos antimicrobianos de *Staphylococcus* spp. isolados de amostras comercializadas de *A. brasiliensis*. (Cont.)

Classe de antibiótico	Antibiótico	Conteúdo do disco (µg)	Intervalo de resistência (mm)	S %	I %	R %	Isolados resistentes
Penicilina	Penicilina	10 (un)	≤ 28	63,2	0	36,8	A1; A5; B4; B6; B10; B11; B13; B14; C2; D1; E2; G1; I1; J2.
	Oxacilina	1					
	Coagulase positivo		≤ 10	100	0	0	
	Coagulase negativo		≤ 17	44,7	0	55,3	A1; A7; B1; B3; B11; B5; B6; B9; B10; B11; B12; B13; B14; C2; D1; E2; E3; E4; F4; H1; J2.
Cefalosporina	Cefoxitina	30					
	Coagulase positivo		≤ 21	100	0	0	
	Coagulase negativo		≤ 24	89,5	0	10,5	B4; B10; B13; E3
Aminoglicosídeo	Gentamicina	10	≤ 12	100	0	0	
Fluoroquinolona	Ciprofloxacino	5	≤ 15	79	21	0	
	Levofloxacino	5	≤ 15	100	0	0	
Fenicol	Cloranfenicol	30	≤ 12	100	0	0	

Tabela 2. Perfis de susceptibilidade aos antimicrobianos de *Staphylococcus* spp. isolados de amostras comercializadas de *A. brasiliensis*. (Conclusão)

Macrolídeo	Eritromicina	15	≤ 12	86,8	7,9	5,3	A4; B10
Lincosamida	Clindamicina	2	≤ 14	34,3	63,1	2,6	E3
Tetraciclina	Tetraciclina	30	≤ 14	94,7	5,3	0	
Ansamicina	Rifampicina	5	≤ 16	100	0	0	

Porcentagem de sensibilidade (S); resistência intermediária (I); e resistência (R) do total de isolados.

Tabela 3. Caracterização fenotípica e genotípica das espécies de estafilococos resistentes a meticilina (MRS) isoladas de amostras ambientais do molusco *A. brasiliana*.

ISOLADO	ESPÉCIE	OXA	CFO	COA	<i>mecA</i>	<i>sea</i>	<i>seb</i>	<i>sec</i>	<i>sed</i>	<i>see</i>	<i>seg</i>	<i>seh</i>
S12	<i>Staphylococcus xylosus</i>	R	S	-	+	-	-	-	-	-	+	+
S15	<i>Staphylococcus xylosus</i>	R	S	-	+	-	-	-	-	-	+	+
S17	<i>Staphylococcus cohnii</i> spp. <i>urealyticus</i>	R	S	-	+	-	-	-	-	-	+	+
S19	<i>Staphylococcus cohnii</i> spp. <i>urealyticus</i>	R	S	-	+	-	-	-	-	-	+	+
S21	<i>Staphylococcus xylosus</i>	R	S	-	+	-	-	-	-	-	+	+
S26	<i>Staphylococcus xylosus</i>	R	S	-	+	-	-	-	-	-	+	+
S28	<i>Staphylococcus cohnii</i> spp. <i>urealyticus</i>	R	S	-	+	-	-	-	-	-	-	+
S35	<i>Staphylococcus sciuri</i>	R	S	-	+	-	-	-	-	-	+	-
S38	<i>Staphylococcus cohnii</i> spp. <i>urealyticus</i>	R	S	-	+	-	-	-	-	-	-	+

OXA: oxacilina; CFO: cefoxitina; R: resistente; S: sensível; COA: Coagulase.

Tabela 4. Caracterização fenotípica e genotípica das espécies de estafilococos resistentes a meticilina (MRS) isoladas de amostras comercializadas do molusco *A. brasiliana*. (Cont.)

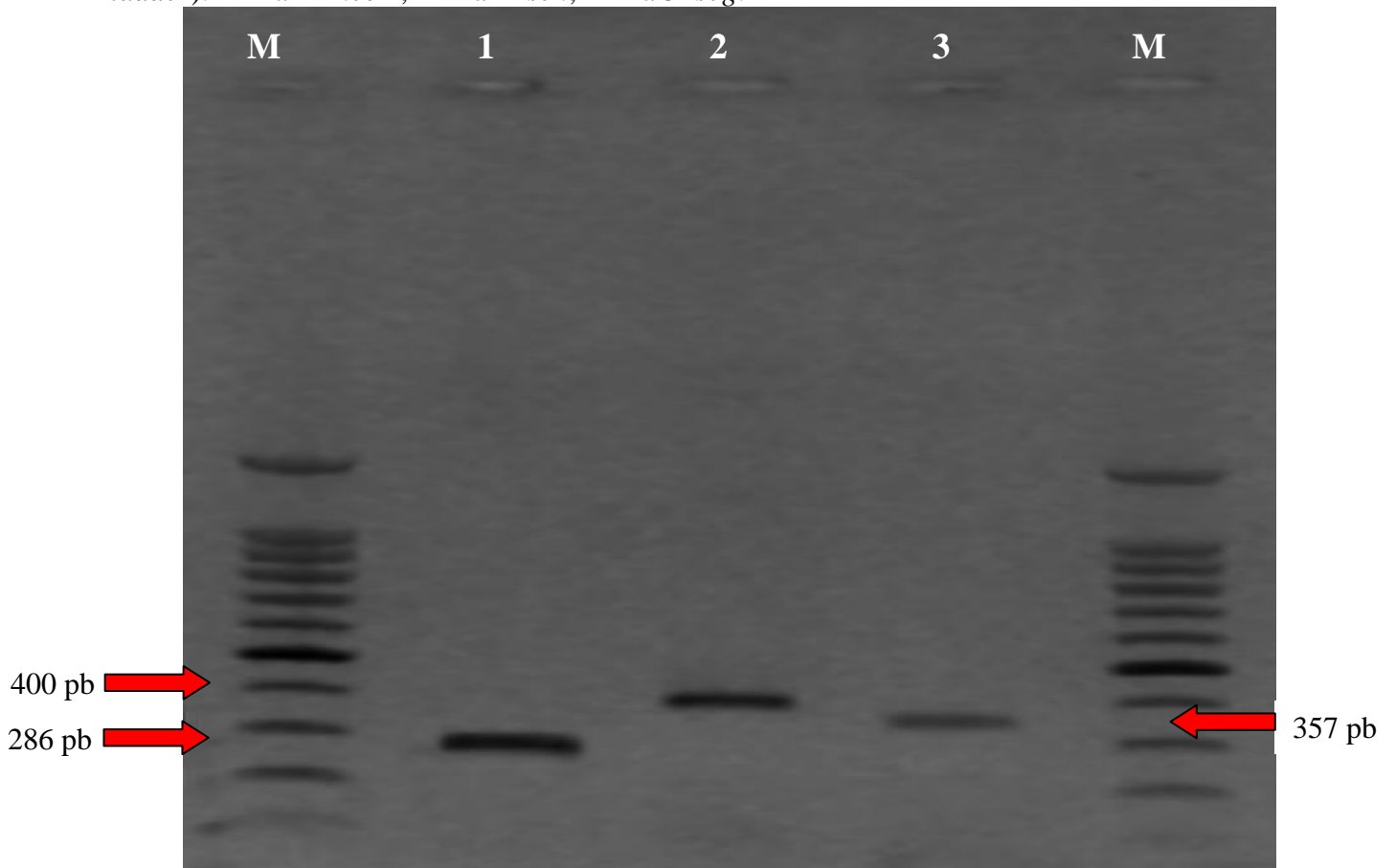
ESTABELECIMENTO	ISOLADO	ESPÉCIE	OXA	CFO	COA	<i>mecA</i>	<i>sea</i>	<i>seb</i>	<i>sec</i>	<i>sed</i>	<i>see</i>	<i>seg</i>	<i>seh</i>
A	A2	<i>Staphylococcus sciuri</i>	R	S	-	+	-	-	-	-	-	+	+
A	A7	<i>Staphylococcus sciuri</i>	R	S	-	+	-	-	-	-	-	+	+
B	B1	<i>Staphylococcus xylosum</i>	R	S	-	+	-	-	-	-	-	+	+
B	B3	<i>Staphylococcus sciuri</i>	R	S	-	+	-	-	-	-	-	+	+
B	B4	<i>Staphylococcus sciuri</i>	R	R	-	+	-	-	-	-	-	+	+
B	B5	<i>Staphylococcus sciuri</i>	R	S	-	+	-	-	-	-	-	+	+
B	B6	<i>Staphylococcus sciuri</i>	R	S	-	+	-	-	-	-	-	+	+
B	B9	<i>Staphylococcus sciuri</i>	R	S	-	+	-	-	-	-	-	+	+
B	B10	<i>Staphylococcus xylosum</i>	R	R	-	+	-	-	-	-	-	+	+
B	B11	<i>Staphylococcus xylosum</i>	R	S	-	+	-	-	-	-	-	-	+
B	B12	<i>Staphylococcus sciuri</i>	R	S	-	+	-	-	-	-	-	+	+
B	B13	<i>Staphylococcus sciuri</i>	R	R	-	+	-	-	-	-	-	+	+
B	B14	<i>Staphylococcus xylosum</i>	R	S	-	+	-	-	-	-	-	+	+
C	C2	<i>Staphylococcus sciuri</i>	R	S	-	+	-	-	-	-	-	+	+
D	D1	<i>Staphylococcus sciuri</i>	R	S	-	+	-	-	-	-	-	+	+
E	E2	<i>Staphylococcus sciuri</i>	R	S	-	+	-	-	-	-	-	-	+
E	E3	<i>Staphylococcus sciuri</i>	R	R	-	+	-	-	-	-	-	+	+

Tabela 4. Caracterização fenotípica e genotípica das espécies de estafilococos resistentes a meticilina (MRS) isoladas de amostras comercializadas do molusco *A. brasiliana*. (Conclusão)

E	E4	<i>Staphylococcus sciuri</i>	R	S	-	+	-	-	-	-	-	+	+
F	F4	<i>Staphylococcus sciuri</i>	R	S	-	+	-	-	-	-	-	+	+
H	H1	<i>Staphylococcus lentus</i>	R	S	-	+	-	-	-	-	-	+	+
J	J2	<i>Staphylococcus sciuri</i>	R	S	-	+	-	-	-	-	-	+	+

OXA: oxacilina; CFO: cefoxitina; R: resistente; S: sensível; COA: Coagulase.

Figura 4. Gel representativo dos produtos de amplificação da PCR dos genes *mecA*, *seg* e *seh* em *Staphylococcus* coagulase-negativos. Nota: Linha **M**, marcador de peso molecular (100pb DNA ladder). Linha **1**- *mecA*, Linha **2**- *seh*, Linha **3**- *seg*.



6. CONCLUSÃO

Neste estudo foi observada a presença de espécies de *Staphylococcus* coagulase-negativas portadoras do gene de resistência à meticilina, a partir de amostras ambientais e comercializadas do molusco bivalve *A. brasiliana*. Além disso, tais espécies apresentaram elevada frequência dos genes toxigênicos (*seg* e *seh*). Este é o primeiro relato de *Staphylococcus* coagulase-negativos resistentes à meticilina no molusco *A. brasiliana*.

7. APÊNDICE

Figura 5- Gel representativo dos produtos de amplificação da PCR do gene *mecA* em *Staphylococcus* coagulase-negativos. Nota: Linha **M**, marcador de peso molecular (100pb DNA ladder). Linha **1**-ATCC 33591 (Controle positivo), Linha **2**- B5, Linha **3**- B9, Linha **4**- B14, Linha **5**- C2, Linha **6**- D1, Linha **7**- E3, Linha **8**- H1, Linha **9**- J2, Linha **10**- Controle negativo.

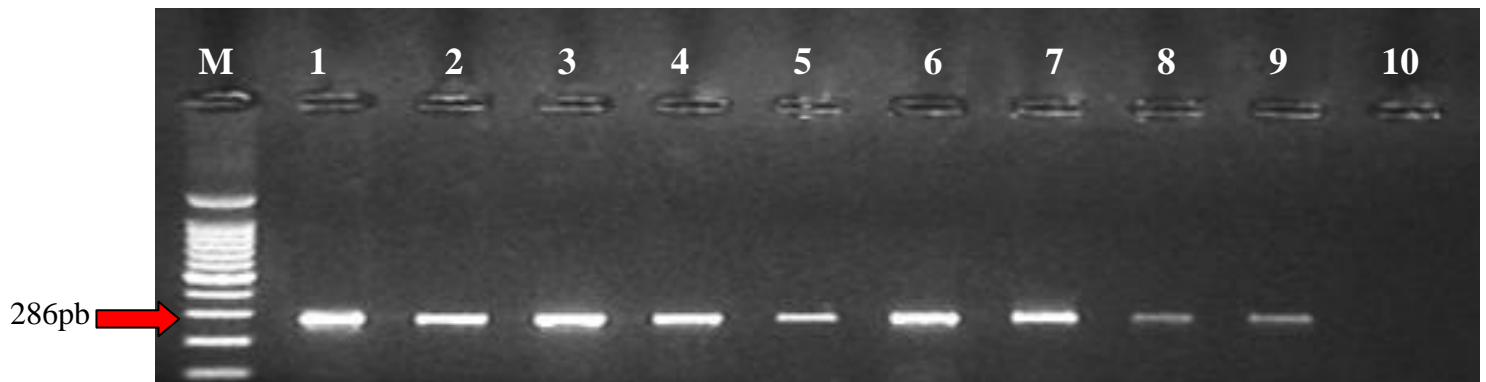


Figura 6- Gel representativo dos produtos de amplificação da PCR do gene *seh* em *Staphylococcus* coagulase-negativos. Nota: Linha **M**, marcador de peso molecular (100pb DNA ladder). Linha **1**- CR-6 (Controle positivo), Linha **2**- S17, Linha **3**- S18, Linha **4**- S20, Linha **5**- S27, Linha **6**- S29, Linha **7**- B9, Linha **8**- C2, Linha **9**- E3, Linha **10**- J2, Linha **11**- F4, Linha **12**- Controle negativo.

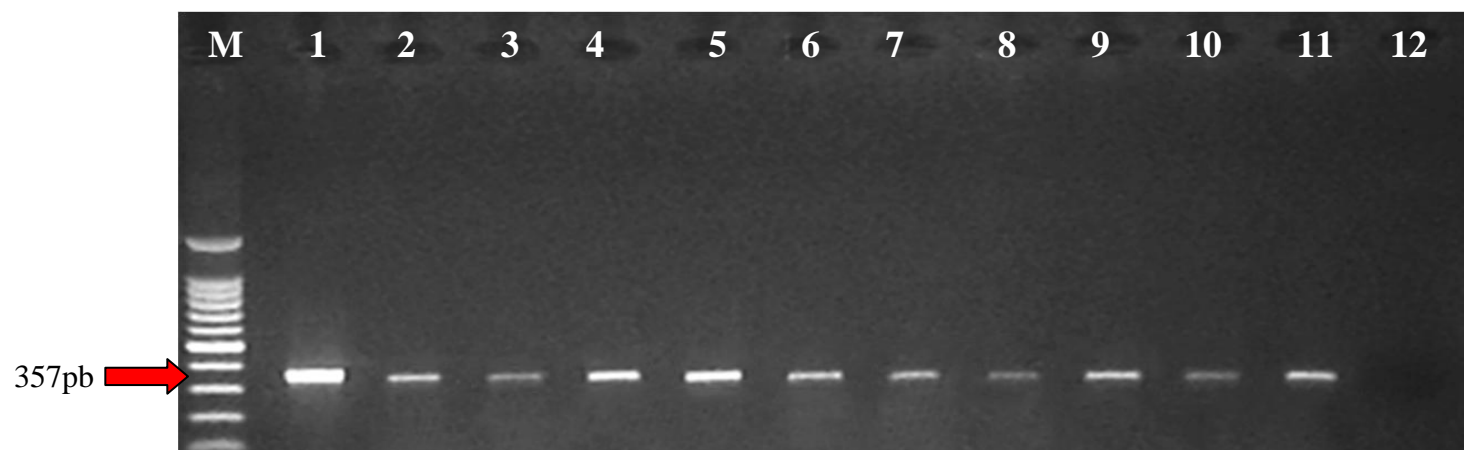


Figura 7- Gel representativo dos produtos de amplificação da PCR do gene *seg* em *Staphylococcus* coagulase-negativos. Nota: Linha M, marcador de peso molecular (100pb DNA *ladder*). Linha 1- FRI 361 (controle positivo), Linha 2- S18, Linha 3- B6, Linha 4- B11, Linha 5- Controle negativo.

