

## ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE *Staphylococcus* spp. PROVENIENTES DE SUSHI

ISABELA SCHNEID KRONING<sup>1</sup>; TASSIANA RAMIRES<sup>2</sup>; MARIANA ALMEIDA IGLESIAS<sup>2</sup>; HELENA REISSIG SOARES VITOLA<sup>2</sup>; ADRIANA SOUTO PEREIRA NÚNCIO<sup>2</sup>; WLADIMIR PADILHA DA SILVA<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – isabelaschneid@gmail.com

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – tassianaramires@gmail.com; maryanaiglesias@hotmail.com; helenarsv@hotmail.com; adrianaspn@hotmail.com;

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – wladimir.padilha2011@gmail.com

### 1. INTRODUÇÃO

Alimentos tradicionais da culinária japonesa, como o sushi e o sashimi, preparados a base de arroz acidificado e peixe cru, vêm ganhando cada dia mais espaço no cenário gastronômico de diversos países (LEISNER et al., 2014). Como estes alimentos são altamente manipulados durante o preparo e a comercialização, além de serem consumidos sem tratamento térmico, podem tornar-se um risco ao consumidor, uma vez que podem carrear micro-organismos potencialmente patogênicos (CHRISTISON, LINDSAY e VON HOLY, 2008; LIANG et al., 2016).

Estudos relatam que este tipo de alimento pode apresentar altos níveis de contaminação, principalmente por *Estafilococos* coagulase positiva (ECP) (LEISNER et al., 2014; LIANG et al., 2016), o que é um fator preocupante uma vez que os manipuladores são potenciais portadores assintomáticos destes micro-organismos (LUONG et al., 2006).

O gênero *Staphylococcus* pertence à família *Staphylococcaceae*, sendo cocos Gram-positivos, anaeróbios facultativos, imóveis e tendem a formar agrupamentos em formato semelhante a cachos de uva. São micro-organismos mesófilos, que se desenvolvem entre 7 °C e 47,8 °C, produzem enterotoxinas entre 10 °C e 46 °C, com produção máxima entre 40 °C e 45 °C, sendo frequentemente envolvidos em surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) (TRABULSI et al., 2008).

Além da produção de enterotoxinas, outros fatores de virulência importantes na patogenia das doenças causadas por *Staphylococcus* spp. são a atividade da enzima DNase, responsável por clivar o DNA celular, a produção de exopolissacarídeo, o qual é uma camada viscosa que dificulta a fagocitose e aumenta a aderência aos tecidos do hospedeiro e as superfícies de equipamentos e utensílios, auxiliando na formação de biofilme, bem como a resistência a antimicrobianos (TRABULSI et al., 2008; GÜNDÖGAN, CITAK e TURAN, 2006).

Diante do exposto, o objetivo do presente estudo foi verificar a presença de ECP em sushis comercializados na cidade de Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil e, a partir dos isolados, realizar a confirmação molecular do gênero *Staphylococcus* e analisar a resistência à acriflavina, a atividade da enzima DNase e a produção de exopolissacarídeo.

### 2. METODOLOGIA

#### 2.1 Isolamento de ECP

Foram realizadas quatro coletas, entre os meses de janeiro e maio de 2016. Em cada coleta foram amostrados seis sushis (arroz, alga e salmão cru),

provenientes de sete diferentes estabelecimentos da cidade de Pelotas, RS. Os sushis foram mantidos em caixas isotérmicas até o momento do processamento das amostras, no Laboratório de Microbiologia de Alimentos DCTA/FAEM/UFPEL. Para o isolamento, 25 g das amostras foram homogeneizadas em 225 mL de água peptonada tamponada (APT, Acumedia®) e, após a realização de diluições decimais seriadas, uma alíquota de 0,1 mL de cada amostra foi semeada em placas contendo ágar Baird-Parker (ABP, Himedia®), as quais foram incubadas a 37 °C por 48 h. As colônias típicas de *Estafilococos* coagulase positiva foram submetidas ao teste de produção de coagulase livre (APHA, 2002).

## 2.2 Análises fenotípicas dos isolados

Os isolados que apresentaram capacidade de produção de coagulase, foram submetidos ao teste de resistência à acriflavina, utilizando-se ágar Baird-Parker suplementado com acriflavina (7 µg.mL<sup>-1</sup>) (Sigma Aldrich®), conforme protocolo descrito por DEVRIESE (1981). O resultado característico é o aparecimento de dois halos ao redor das colônias, indicando resistência à acriflavina.

A produção de DNase foi realizada conforme protocolo descrito por WECKMAN e CATLIN (1957), tendo como resultado positivo o aparecimento de um halo transparente ao redor do cultivo, após a adição de ácido clorídrico 1N.

A produção de exopolissacarídeo foi verificada através do uso do ágar Vermelho Congo, conforme descrito por FREEMAN, FALKINER e KEANE (1989), tendo como resultado positivo, o aparecimento de colônias pretas com uma consistência cristalina e seca.

## 2.3 Análise molecular para identificação do gênero *Staphylococcus*

Foi utilizada a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), tendo-se como alvo o gene 16S do rRNA, segundo protocolo descrito por BARON et al. (2004).

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Segundo a RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001, o limite tolerado de ECP em produtos a base de carnes, pescados e similares crus, onde se inclui o sushi, é de 5 x 10<sup>3</sup> UFC.g<sup>-1</sup> (BRASIL, 2001). A Tabela 1 apresenta os dados obtidos no isolamento de ECP, expressos em UFC.g<sup>-1</sup> de sushi.

Tabela 1 – Resultados das contagens (UFC.g<sup>-1</sup>) obtidas no isolamento de ECP

Estabelecimentos	Coleta 1	Coleta 2	Coleta 3	Coleta 4
1	4 x 10 <sup>3</sup>	2 x 10 <sup>2</sup>	SC	SC
2	3 x 10 <sup>3</sup>	1,2 x 10 <sup>3</sup>	1,0 x 10 <sup>3</sup>	2,4 x 10 <sup>4</sup>
3	3 x 10 <sup>3</sup>	1,8 x 10 <sup>3</sup>	SC	3,0 x 10 <sup>2</sup>
4	1,9 x 10 <sup>5</sup>	SC*	2,0 x 10 <sup>3</sup>	2,3 x 10 <sup>4</sup>
5	1,5 x 10 <sup>5</sup>	SC	1,5 x 10 <sup>5</sup>	2,0 x 10 <sup>3</sup>
6	2,5 x 10 <sup>4</sup>	2,9 x 10 <sup>3</sup>	3,7 x 10 <sup>4</sup>	4,0 x 10 <sup>2</sup>
7	1,3 x 10 <sup>4</sup>	SC	SC	7,0 x 10 <sup>4</sup>

\*Sem crescimento

Na primeira coleta foram encontradas amostras de sushis com contagens de ECP acima do permitido pela legislação brasileira, em quatro estabelecimentos (57,1%). Na segunda coleta, nenhum dos estabelecimentos apresentou sushis com contagens consideradas inaceitáveis. Já na terceira e quarta coletas,

novamente houve amostras com contagem acima do permitido pela legislação, 28,6% e 42,9%, respectivamente.

Todos os isolados foram confirmados como *Staphylococcus* spp. pela análise molecular, tendo em vista que houve amplificação do fragmento de 252 pb referente ao gene 16S do rRNA. Sendo assim, mais análises moleculares serão realizadas para a confirmação da espécie de *Staphylococcus* isolados de sushi na cidade de Pelotas/RS. ATANASSOVA, REICH & KLEIN (2008) encontraram *Staphylococcus* spp. em todas as amostras de sushi analisadas, com contagens médias de  $10^4$  UFC.g<sup>-1</sup>. Já MARTINS (2006) avaliou 20 amostras de sushi e sashimi, oriundos de diferentes estabelecimentos em São Paulo, e encontrou nove amostras contaminadas por *Staphylococcus* spp., sendo três com contagens acima do estipulado pela legislação.

A contaminação encontrada em sushis pode estar relacionada com condições higiênico-sanitárias inadequadas na preparação do alimento, principalmente em relação aos manipuladores, uma vez que 25 a 40% da população humana carrega *Staphylococcus* spp. (LUONG et al., 2006).

A resistência à acriflavina foi observada em 62,5 % dos isolados. Este teste foi realizado, pois, segundo CAPURRO et al. (2010) e DEVRIESE (1981), das 3 espécies de ECP (*S. aureus*, *S. hyicus* e *S. intermedius*), apenas *S. aureus* é resistente a este antimicrobiano. Dessa forma esse resultado sugere uma possível prevalência de *S. aureus* entre os ECP presentes nos sushis amostrados, no entanto, levando-se em consideração a variação que pode ocorrer nas características bioquímicas, há necessidade da posterior confirmação molecular dos isolados.

Nove dos vinte e quatro isolados (37,5%) apresentaram atividade da enzima DNase. Esta enzima é, frequentemente, utilizada para distinguir ECP patogênicos de não patogênicos, sendo importante na patogênese de ECP, juntamente com a coagulase (PFALLER e HERWALDT, 1988).

Verificou-se que 12,5% dos isolados (3/24) produziram exopolissacarídeo, portanto, são potenciais produtores de biofilme. HAMMADI e YOUSIF (2014) avaliaram 17 isolados de *S. aureus*, e encontraram apenas dois isolados produtores de exopolissacarídeo, resultado similar ao obtido neste estudo. Por outro lado, VASUDEVAN et al. (2003) encontraram que 32 entre 35 isolados de *S. aureus* apresentavam capacidade de produzir exopolissacarídeo após 24-48 h, entretanto, todos os isolados produziram exopolissacarídeo após 72 h, concluindo que a produção depende do período de incubação.

#### 4. CONCLUSÕES

Há presença de *Staphylococcus* spp. em sushis comercializados em Pelotas, RS e, em cerca da metade das amostras, esses micro-organismos foram encontrados em níveis considerados inaceitáveis, segundo a legislação brasileira. Este resultado denota um risco para os consumidores, uma vez que se trata de um produto altamente manipulado e consumido cru, sem tratamento térmico adicional.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION - APHA, **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**, 4 ed., Washington, 2002.

- ATANASSOVA, V., REICH, F., KLEIN, G. Microbiological Quality of Sushi from Sushi Bars and Retailers. **Journal of Food Protection**. n. 4, p. 860-864, 2008.
- BARON, F., COCHET, M.F., PELLERIN, J., BEN ZAKOUR, N., LEBON, A., NAVARRO, A., PROUDY, I., LE LOIR, Y., GAUTIER, M. Development of a PCR test to differentiate between *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus intermedius*. **Journal of Food Protection**, v. 67, p. 2302 e 2305, 2004.
- BRASIL- **AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA** - ANVISA. Resolução - RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 10 jan. 2001. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12\\_01rdc.htm/](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_01rdc.htm/)>
- CAPURRO, A., ASPAN, A., ERICSSON UNNERSTAD, H., PERSSON WALLER, K., ARTURSSON, K., Identification of potential sources of *Staphylococcus aureus* in herds with mastitis problems. **Journal Dairy Science**, v. 93, p. 180 e 191, 2010.
- CHRISTISON, C.A.; LINDSAY, D.; VON HOLY, A. Microbiological survey of ready-to-eat foods and associated preparation surfaces in retail delicatessens, Johannesburg, South Africa. **Food Control** v. 19, p. 727–733, 2008.
- DEVRIESE, L.A. Baird-Parker medium supplemented with acriflavine, polymyxins and sulphonamide for the selective isolation of *Staphylococcus aureus* from heavily contaminated materials. **Journal Applied Bacteriology**, v. 50, p. 351 e 357, 1981.
- GÜNDOĞAN, N.; CITAK, S.; TURAN, E. Slime production, DNase activity and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from raw milk, pasteurised milk and ice cream samples. **Food Control**, v.17, p. 389–392, 2006.
- HAMMADI, K, M; YOUSIF, A. A. Detection of slime material in *Staphylococcus aureus* bacteria from ovine mastitis by transmission electron microscope and Congo red agar method. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 3 n.. 4, 2014.
- LEISNER, J.J.; LUND, T.B.; FRANDSEN, E.A.; ANDERSEN, N.B.E.; FREDSLUND, L.; NGUYEN, V.P.T.; KRISTIANSEN, T. What consumers expect from food control and what they get - A case study of the microbial quality of sushi bars in Denmark. **Food Control** v. 45, p.76 e 80, 2014.
- LIANG, WEI-LONG; PAN, YA-LI; CHENG, HUAN-LE; LI, TUNG-CHING; PETER HOI-FU YU , SHUN-WAN CHAN. The microbiological quality of take-away raw salmon finger sushi sold in Hong Kong. **Food Control** v. 69, p. 45 e 50, 2016.
- LUONG, T.; DUNMAN, P. M.; MURPHY, E.; PROJAN, S. J.; Y. LEE, C. Y. Transcription Profiling of the *mgrA* Regulon in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**, v. 188, n. 05, p. 1899–1910, 2006.
- MARTINS, F, O. **Avaliação da qualidade higiênico-sanitária de preparações (sushi e sashimi) a base de pescado cru servidos em bufês na Cidade de São Paulo**. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Saúde Pública, USP – São Paulo, 2006.
- PFALLER, M. A., HERWALDT, L. A. Laboratory, clinical and epidemiological aspects of coagulase negative staphylococci. **Clinical Microbiology**, 37, 201–205, 1988.
- SIMÕES, M.; SIMÕES, L.; VIEIRA, M. A review of current and emergent biofilm control strategies. **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, p. 573-583, 2010.
- TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O.F.; CANDEIAS, J.A.N. **Microbiologia**. 5 ed. São Paulo, 2008.
- WECKMAN, B. G., CATLIN, B. W. Deoxyribonuclease activity of micrococci from clinical sources. **Journal of Bacteriology**. 73: 747-753, 1957.