

ISOLAMENTO DE *Staphylococcus aureus* DE LEITE E FEZES DE BOVINOS LEITEIROS

CELINA NUNES EBERSOL¹; THAMÍRIS PEREIRA DE MORAES²; DÉBORA RODRIGUES SILVEIRA³; KAUANA KAEFER⁴; CLÁUDIO DIAS TIMM⁵

¹ Universidade Federal de Pelotas – celinanunesebersol@outlook.com

² Universidade Federal de Pelotas – thamiris.p@outlook.com

³ Universidade Federal de Pelotas – debora.rsilveira@hotmail.com

⁴ Universidade Federal de Pelotas – kauanakafer@gmail.com

⁵ Universidade Federal de Pelotas – timm@ufpel.edu.br

1. INTRODUÇÃO

O leite e os produtos lácteos desempenham um papel nutricional importante para o ser humano, pois são alimentos que fornecem proteínas, carboidratos, gorduras e sais minerais necessários ao desenvolvimento do organismo (FONSECA & SANTOS, 2000). Devido à sua riqueza nutritiva, o leite constitui um excelente meio de cultura para o desenvolvimento de diversos micro-organismos, incluindo os patogênicos, podendo transmitir importantes enfermidades a quem o consome (FRAZIER, 1993). Portanto, existe uma grande preocupação em assegurar a integridade e a qualidade intrínseca do leite e seus derivados destinados ao consumo humano (FAGUNDES & OLIVEIRA, 2004).

Através da ingestão de alimentos ou água contaminados por micro-organismos patogênicos podem ocorrer doenças transmitidas por alimentos (DTAs). Alimentos contaminados por agentes biológicos são a maior causa dessas enfermidades (NOTERMANS & VERDEGAAL, 1992). O leite e seus derivados se tratam de um grupo de alimentos significativo em casos e surtos de intoxicações causadas por *Staphylococcus* coagulase positiva. As espécies de maior interesse em microbiologia de alimentos por causarem intoxicações em decorrência da ingestão de enterotoxinas pré-formadas são *Staphylococcus aureus*, *S. hyicus* e *S. intermedius* (FRANCO e LANDGRAF, 2008). O homem e os animais são os principais reservatórios de *S. aureus*, estando presente nas vias respiratórias e pele, além de ser um dos principais agentes etiológicos da mastite bovina (DOYLE e BUCHANAN, 2012). Os casos de gastroenterite estafilocócica cursam, na maioria dos casos, com náuseas, vômitos, contrações abdominais, diarreia, sudorese e cefaleia (BALABAN & RASOOLY, 2000).

A multiplex PCR (mPCR) é uma técnica molecular de interesse para diagnóstico em microbiologia de alimentos, que utiliza mais de um par de *primers* na mesma reação, possibilitando a amplificação simultânea de diferentes sequências de DNA de diferentes micro-organismos (TANG E PERSING, 1999). A reação em cadeia da polimerase de elementos repetitivos (rep-PCR) é outra técnica molecular de importância, que utiliza *primers* que são complementares a sequências repetitivas altamente conservadas no DNA, apresentando múltiplas cópias no genoma da maioria das bactérias, as quais variam em número entre diferentes cepas (VERSALOVIC et al., 1994). Essa técnica permite a obtenção de padrões específicos para espécies e linhagens bacterianas, possibilitando a verificação da ocorrência de similaridade entre os micro-organismos (DOWNES, 2001). Diante disso, a similaridade entre isolados é capaz de apontar possíveis fontes de contaminação nos alimentos destinados ao consumo humano.

O objetivo desse trabalho foi verificar a presença de *Staphylococcus aureus* e a similaridade de cepas isoladas de fezes e leite de bovinos leiteiros

oriundos de uma propriedade leiteira localizada na região sul do Rio Grande do Sul.

2. METODOLOGIA

Foram coletadas amostras de fezes e leite de 13 vacas leiteiras, em produção, de um estabelecimento leiteiro localizado no sul do Rio Grande do Sul. As amostras de fezes foram obtidas através da inserção de zaragatoas estéreis no reto dos animais e, posteriormente, acondicionadas em meio de transporte Cary Blair (Himedia, Mumbai, Índia). Foram coletados cem mililitros de leite de cada vaca, em frascos estéreis no início da ordenha após descarte dos três primeiros jatos, com cuidados de antissepsia dos tetos e das mãos do operador. Cada amostra foi constituída pela mistura de porções de leite de cada uma das quatro glândulas mamárias. Todas as amostras foram encaminhadas ao laboratório em caixas isotérmicas com gelo.

A determinação da presença de *Staphylococcus* coagulase positiva foi realizada conforme os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal recomendados pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2003), com modificações. As zaragatoas com as amostras de fezes e uma alíquota do leite foram diretamente semeadas em superfície de ágar Baird-Parker (Himedia) e incubadas a 37°C por 48 horas. Três a cinco colônias típicas e atípicas foram inoculadas em caldo Infusão de Cérebro e Coração (BHI, Acumedia) e incubadas a 37°C por 24 horas para realização da prova da coagulase, que consiste na mistura de 0,3 mL de cada cultura com 0,3 mL de plasma de coelho e incubação a 37°C por 6 horas para observação de coagulação.

O DNA dos isolados de *Staphylococcus* coagulase positiva foi extraído conforme Sambrook e Russel (2001) e foi realizada multiplex-PCR, pesquisando a presença do gene *nuc* com uso dos *primers* au-F3, au-nucR, in-F, in-R3, hy-F1 e hy-R1 (SASAKI et al., 2010) para identificação das espécies *S. aureus*, *S. intermedius* e *S. hyicus*. Os perfis moleculares dos isolados foram analisados através da rep-PCR, fazendo uso do *primer* (GTG)₅ (VERSALOVIC et al., 1994). Os perfis de bandas obtidos foram analisados segundo TENOVER et al. (1995).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram coletadas 13 vacas, sendo, então 13 amostras de leite e o mesmo número de amostras de fezes. Duas (15,4%) amostras de leite e uma (7,6%) de fezes foram positivas para *S. aureus*. Um dos animais coletados apresentou positividade em ambas amostras e os dois isolados apresentaram idêntico perfil de bandas na rep-PCR. O restante das vacas amostradas não apresentou resultados positivos para *S. aureus* nas fezes e no leite.

O micro-organismo patogênico mais frequentemente isolado no leite cru é *S. aureus* (ZECCONI & HAHN, 2000). Essa bactéria está presente em cerca de 50% das infecções da glândula mamária dos bovinos leiteiros (BRABES et al., 1999), o que explica o seu isolamento no nosso estudo. Segundo RIEDEL (1992), em relação ao leite e seus derivados, os cuidados higiênicos para evitar a contaminação devem iniciar no momento da ordenha e continuar até a obtenção do produto final.

A presença da mesma cepa no leite e nas fezes de um dos animais coletados indica que houve contaminação da glândula mamária pelas fezes. Esse fato ressalta a importância dos cuidados higiênicos no manejo dos animais e da

ordenha, de forma a prevenir a contaminação da glândula mamária por micro-organismos patogênicos de origem intestinal.

4. CONCLUSÕES

S. aureus pode estar presente no trato intestinal das vacas leiteiras em produção e, pelas fezes, chegar na glândula mamária, sendo eliminado por via mamária e entérica.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BALABAN, N.; RASOOLY, A. Staphylococcal enterotoxins: a review. **Int J Food Microbiol**, v.61, p.1-10, 2000.

BRABES, K. et al. Participação de espécies coagulase positivas e negativas produtoras de enterotoxinas de gênero *Staphylococcus* na etiologia de casos de mastite bovina em propriedades de produção leiteira dos estados de São Paulo e Minas Gerais. **Rev Napgama**, v.3, p.4-11, 1999.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água: Instrução Normativa nº 62, de 26/08/2003. **Diário Oficial da União**, Brasília. Seção I, p. 14-51. 2003.

DOYLE, M. P.; BUCHANAN, R. L. **Food microbiology: fundamentals and frontiers**. Washington: ASM Press, 2012.

FAGUNDES, H.; OLIVEIRA, C.A.F. Infecções intramamárias causadas por *Staphylococcus aureus* e suas implicações em saúde pública. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, n.4, p.1315-1320, 2004.

DOWNES, F. P., ITO, H. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4. ed. Washington: American Public Health Association (APHA), 2001.

FONSECA, L.F.L.; SANTOS, M.V. **Qualidade do leite e controle de mastite**. São Paulo: Lemos Editorial, 2000.

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

FRAZIER, W. C. **Microbiologia de los alimentos**. Espanha: Acribia, 1993.

NOTERMANS, S.; VERDEGAAL, A. H. Existing and emergin foodborne diseases. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 15, p. 197-205, 1992.

RIEDEL, G. **Controle Sanitário dos Alimentos**. 2ª ed. São Paulo: Atheneu, p. 320, 1992.



SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 3ªed. Nova York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SASAKI, T.; TSUBAKISHITA, S.; TANAKA, Y.; SAKUSABE, A.; OHTSUKA, M.; HIROTAKI, S.; KAWAKAMI, T.; FUKATA, T.; HIRAMATSU, K. Multiplex-PCR method for species identification of coagulase-positive staphylococci. **J Clin Microbiol** p.:765–769, 2010.

TANG, Y.; PERSING, D. **Manual of clinical microbiology**. Washington, D.C.: ASM, 1999.

TENOVER, F. C.; ARBEIT, R. D.; GOERING, R. V.; MICKELSEN, P. A.; MURRAY, B. E.; PERSING, D. H.; SWAMINATHAN, B. Interpreting Chromosomal DNA Restriction Patterns Produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: Criteria for Bacterial Strain Typing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 9, p. 2233-2239, 1995.

VERSALOVIC, J.; SCHNEIDER, M.; DE BRUIJN, F. J.; LUPSKI, J. R. Genomic fingerprinting of bacteria with repetitive sequencebased polymerase chain reaction. **Methods in Molecular and Cellular Biology**, v. 5, p. 25–40, 1994.

ZECCONI, A.; HAHN, G. *Staphylococcus aureus* in raw milk and human health risk. **Bulletin of IDF**, v.345, p.1518, 2000.