

ISOLAMENTO DE *Staphylococcus aureus* ENTEROTOXIGÊNICOS RESISTENTES A METICILINA DE LINGUIÇA SUÍNA

KAUANA KAEFER¹; THAÍS GONÇALVES GONÇALVES²; JULIANA
FERNANDES ROSA³; THAMÍRIS PEREIRA DE MORAES⁴; CLÁUDIO DIAS
TIMM⁵

¹Universidade Federal de Pelotas – kauanakaefer@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – thaais.g@hotmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – ju_fernandes.r@hotmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – thamiris.p@outlook.com

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

1. INTRODUÇÃO

O mercado de carne suína vem apresentando um crescimento contínuo no Brasil, passando esse alimento a ter uma maior participação na dieta dos brasileiros, principalmente sob a forma de produtos industrializados (ABIPECS, 2019). Dentre esses, destaca-se a linguiça frescal devido à sua grande aceitação pelos consumidores e ampla comercialização.

A produção de linguiça suína envolve várias etapas de manipulação, elevando o risco de contaminação por microrganismos patogênicos, como *Staphylococcus aureus*, devido a falhas e não conformidades em seu processamento, podendo comprometer a qualidade higiênico-sanitária do alimento (MARQUES, 2006).

S. aureus é um patógeno comumente encontrado na pele e nas vias aéreas superiores de pessoas saudáveis, podendo ser encontrado também no trato gastrointestinal. Essa espécie é a que mais está ligada a doenças estafilocócicas, quer sejam de origem alimentar ou não. Produzem vários tipos de toxinas, sendo as enterotoxinas as de interesse em alimentos e cursam com vômito, cólicas abdominais, diarreia e, mais raramente, enterite (FRANCO; LANDGRAF, 2005). Essas enterotoxinas estafilocócicas (*Staphylococcal enterotoxins*, SE) são termorresistentes, portanto, uma vez pré-formadas não são eliminadas durante o processamento térmico dos alimentos (CARMO et al., 2002). As cinco primeiras SEs descobertas (SEA, SEB, SEC, SED e SEE) são referidas como as enterotoxinas estafilocócicas clássicas e, geralmente, são as mais implicadas em surtos de intoxicação alimentar (LINA et al., 2004). Surtos de intoxicação estafilocócica envolvendo a SEC já foram relatados (DENAYER et al., 2017; CARMO et al., 2003).

Animais domésticos podem abrigar a espécie *S. aureus* sendo esta uma relevante causa de infecções na produção animal. Assim, é comum o uso de antibióticos com fins terapêuticos, profiláticos ou como estimulador de crescimento (CERQUEIRA; ALMEIDA, 2013). Porém, seu uso indiscriminado pode estimular o aparecimento de resistência a alguns antimicrobianos, dentre eles a meticilina. As cepas de *S. aureus* resistentes a esse fármaco são denominadas *Staphylococcus aureus* meticilina resistentes (*Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*, MRSA) e são consideradas resistentes a todos os antimicrobianos beta-lactâmicos (LOWY, 1998). Para a identificação de MRSA, o método mais utilizado é o teste de disco difusão, podendo ser utilizados os antibióticos oxacilina e cefoxitina, uma vez que a meticilina não é mais fabricada (MIMICA; MENDES, 2007; ZURITA et al., 2010). Como consequência da colonização e infecção por MRSA em animais de produção, destaca-se a

possibilidade de contaminação dos produtos cárneos destinados ao consumo por esses microrganismos.

O objetivo do presente trabalho foi verificar a presença de *S. aureus* resistentes a meticilina em linguças suínas e a presença do gene codificador da enterotoxina C.

2. METODOLOGIA

Foram analisadas 50 amostras de linguça suína crua, coletadas de mercados e açougues da cidade de Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil. As amostras coletadas foram acondicionadas em caixa isotérmica com gelo e transportadas ao Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal – LIPOA, da Universidade Federal de Pelotas – UFPel.

Para a contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva, 25 g de cada amostra foram adicionadas a 225 mL de solução salina 0,85% e homogeneizadas em *Stomacher* (Logen Scientific). Foram feitas diluições seriadas e, com o auxílio de uma pipeta, foi transferido 0,1 mL de cada diluição para placas de Petri contendo Ágar Baird-Parker (Himedia, Mumbai, Índia) e, a seguir, o inóculo foi espalhado por toda a superfície do Ágar utilizando-se a técnica de semeadura em superfície. Posteriormente as placas foram incubadas a 37° C por 48 h. Após a incubação, foram selecionadas as placas que continham entre 20 e 200 colônias para contagem. Três colônias típicas e três atípicas de *S. aureus* foram inoculadas em Infusão de Cérebro e Coração (BHI, *Brain Heart Infusion*, Himedia, Índia) e incubadas a 37° C por 24 h para posterior 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 h para observação de coagulação.

Foi realizada a extração do DNA dos isolados positivos no teste da coagulase, conforme Sambrook e Russel (2001), e após foi realizada a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), pesquisando a presença do gene *nuc* com uso dos *primers* au-F3 e au-nucR (SASAKI et al., 2010) para identificação da espécie *S. aureus*. As cepas confirmadas como *S. aureus* foram submetidas ao teste de disco difusão em Ágar Müller-Hinton (Kasvi, Brasil), utilizando o disco de cefoxitina 30 µg (Laborclin, Brasil) para a identificação de MRSA. Os resultados obtidos foram avaliados segundo o Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais (*Clinical and Laboratory Standards Institute*, CLSI) (2015), que considera o microrganismo resistente à cefoxitina quando o halo possuir diâmetro menor ou igual a 21 mm e sensível halo com diâmetro maior ou igual a 22 mm.

Para a identificação do gene codificador da enterotoxina estafilocócica C (SEC) nos isolados confirmados como *S. aureus*, foi realizada a PCR conforme descrito por Cunha et al. (2007) com modificações.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 50 amostras analisadas, 8% (4/50) apresentaram contagens de *Staphylococcus* coagulase positiva acima do padrão estabelecidos pela Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº12/01 (BRASIL, 2001), que admite contagens até $5,0 \times 10^3$ UFC/g para linguças cruas. Resultado semelhante ao nosso foi encontrado por Valiati et al. (2016), os quais constataram que 6,6% (2/30) das amostras de linguças cruas analisadas, oriundas de supermercados da cidade de Ji-Paraná, Rondônia, apresentaram contagens de *Staphylococcus* coagulase positiva acima do limite determinado pela legislação. As altas contagens desses microrganismos podem ser devido às más condições de

higiene do local de preparo do alimento e das mãos dos manipuladores e ausência de boas práticas de fabricação.

S. aureus foi isolado de 44% (22/50) das amostras e, desses, 73% (16/22) foram classificados como MRSA e 32% (7/22) possuíam o gene codificador da SEC. Dos 16 isolados MRSA, 25% (4/16) possuíam o gene codificador da SEC e dos sete isolados que apresentavam o gene codificador da SEC, 57% eram MRSA.

Outros estudos envolvendo pesquisa de MRSA e SEs em produtos oriundos de suínos já foram relatados. Savariraj et al. (2018) investigaram a presença de *S. aureus* em carne suína, a resistência a metilicina e a presença de genes codificadores de nove tipos de SE nas cepas isoladas. Das 120 amostras analisadas, 77% (92/120) estavam contaminadas com o microrganismo em questão, 76% (70/92) desses foram classificados como MRSA e 83% (76/92) eram cepas enterotoxigênicas. A grande maioria dos isolados de MRSA era produtor de pelo menos uma das nove toxinas pesquisadas (66/70), estando o gene codificador da SEC presente em 5% (4/66) dos isolados, resultado inferior ao encontrado no presente estudo.

A alta prevalência de MRSA encontrada no presente estudo e no trabalho citado deve servir como um alerta à saúde pública sobre a necessidade de adoção de medidas de controle tanto na produção de animais quanto na cadeia de produção de alimentos para reduzir a contaminação dos produtos com MRSA e assim diminuir o risco de transmissão desse microrganismo às pessoas.

A presença de genes codificadores de enterotoxinas em cepas de *S. aureus* indica que é possível ocorrer a produção da toxina no alimento e, dependendo de fatores como a quantidade de toxina ingerida, provocar uma intoxicação alimentar.

4. CONCLUSÕES

Staphylococcus aureus metilicina resistentes e produtores da enterotoxina estafilócica C podem ser isolados de linguiças suínas cruas representando um potencial risco para a saúde dos consumidores.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA PRODUTORA E EXPORTADORA DE CARNE SUÍNA – ABIPECS. Relatório 2018/2019. 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasil, n. 7-E, p. 46-53, 10 jan. 2001. Seção I.

CARMO, L.S.; DIAS, R.S.; LINARDI, V.R.; SENA, M.J.; SANTOS, D.A.; FARIA, M.E.; PENA, E.C.; JETT, M.; HENEINE, G.L. Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in Minas cheese and raw milk in Brasil. **Food Microbiology**, Turim, v.19, n.1, p.9-14, 2002.

CARMO, L.S.; DIAS, R.S.; LINARDI, V.R., SENA, M.J.; DOS SANTOS, D.A. An outbreak of staphylococcal food poisoning in the municipality of Passos, MG, Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 46, n. 9, p.581-586, 2003.

CERQUEIRA, E.S.; ALMEIDA, R.C.C. *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina (MRSA) em alimentos de origem animal: uma revisão sistemática, **Revista Instituto Adolf Lutz**, São Paulo, v.72, n.4, p. 268-281, 2013.

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Twenty Fourth Informational Supplement. CLSI document M100-S24. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2015.

CUNHA, M.R.L.S.; CALSOLARI, R.A.O.; JÚNIOR, J.P.A. Detection of Enterotoxin and Toxic Shock Syndrome Toxin 1 Genes in *Staphylococcus*, with Emphasis on Coagulase-Negative Staphylococci. **Microbiology and Immunology**, Austrália, v.51, n.4, p.381-390, 2007.

DENAYER, S.; DELBRASSINNE, L.; NIA, Y.; BOTTELDOORN, N. Food-Borne Outbreak Investigation and Molecular Typing: High Diversity of *Staphylococcus aureus* Strains and Importance of Toxin Detection. **Toxins**, Basileia, v.9, n.12, p. 1-13, 2017.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2003.

LINA, G.; BOHACH, G.A.; NAIR, S.P.; HIRAMATSU, K.; JOUVIN-MARCHE, E.; MARIUZZA, R. Standard nomenclature for the superantigens expressed by *Staphylococcus*. **The Journal of Infectious Diseases**, Oxford, v. 189, n. 12, p. 2334–2336, 2004.

LOWY, F.D. *Staphylococcus aureus* infections. **The New England Journal of Medicine**, v.339, n.8, p.520-532, 1998.

MARQUES, S.C.; BOARI, C.A.; BRCKO, C.C.; NASCIMENTO, A.D.; PICCOLI, R.H. Avaliação higiênico-sanitária de linguças tipo frescal comercializadas nos municípios de Três Corações e Lavras MG. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.30, n.6, p.1120-1123, 2006.

MIMICA, M.J.; MENDES, C.M.F. Diagnóstico laboratorial da resistência à oxacilina em *Staphylococcus aureus*. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.43, n.6, p.399-406, 2007.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 3 ed. Nova York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 999 p

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. **Journal of Clinical Microbiology**, v.48, n.3, p.765– 769, 2010.

SAVARIRAJ, W.R.; RAVINDRAN, N.B.; KANNAN, P.; PARAMASIVAN, R.; SENTHILKUMAR, T.; KUMARASAMY, P.; RAO, V.A. Prevalence, antimicrobial susceptibility and virulence genes of *Staphylococcus aureus* isolated from pork meat in retail outlets in India. **Journal of food safety**, v.39, n.1, 2018.

VALIATI, T.B.; BARCELOS, I.B.; CALEGARI, G.M.; SILVA, W.M.C.; ALMEIDA, F.K.V.; PRAZERES, P.F.L.; SOBRAL, F.O.S.; ROMÃO, N.F.; GASPAROTTO, P.H.G. Avaliação microbiológica de linguças tipo frescal comercializadas em supermercados do município de Jiparaná, Rondônia. **Revista da Universidade do Vale do Rio Verde**, Três corações, v.14, n.2, 2016.

WEESE, J. S.; VAN DUIJKEREN, E. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudointermedius* in veterinary medicine. **Veterinary Microbiology**, v.140, n.3, p.418-429, 2010.

ZURITA, J.; MEJIA, C.; GUZMÁN- BLANCO, M. Diagnóstico e teste de sensibilidade para *Staphylococcus aureus* resistente à metecilina na América Latina. **Brazilian Journal Infectious Diseases**, Salvador, v.14, n.2, 2010.