

PRESENÇA DE GENES DE ENTEROTOXINAS EM CEPAS DE *Staphylococcus* COAGULASE NEGATIVA ISOLADAS DE SUÍNOS E RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS

**THAÍS GONÇALVES GONÇALVES¹; DÉBORA RODRIGUES SILVEIRA²;
GREYCE SILVEIRA MELLO³; KAUANA KAEFER⁴; CLÁUDIO DIAS TIMM⁵.**

¹ Universidade Federal de Pelotas – thais.g@hotmail.com

² Universidade Federal de Pelotas – debora.rsilveira@hotmail.com

³ Universidade Federal de Pelotas – greycemello@gmail.com

⁴ Universidade Federal de Pelotas – kauanakafer@gmail.com

⁵ Universidade Federal de Pelotas – timmm@ufpel.tche.br

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o quarto maior produtor e exportador de carne suína, contribuindo com 3% da produção mundial e 9% da exportação dessa proteína (ABPA, 2018). É um alimento rico em nutrientes, constituído por 75% de água, 22,8% de proteínas, 1,2% de gordura e 1,0% de minerais, além de excelente fonte de vitaminas, zinco, potássio, ferro e magnésio (ROÇA, 2008). Entretanto, por seu alto teor de umidade e nutrientes, esse produto é capaz de tornar-se um importante veículo de transmissão de bactérias patogênicas, e dessa forma, pode causar doenças transmitidas por alimentos (DTA), que ocorrem pela ingestão de alimentos contaminados por microrganismos patogênicos e/ou suas toxinas (MACHADO et al., 2014).

As bactérias do gênero *Staphylococcus* dividem-se em dois grandes grupos, com base na produção da enzima coagulase, os *Staphylococcus* coagulase positiva (SCP) e os *Staphylococcus* coagulase negativa (SCN) (OLIVEIRA, 2014). Por muito tempo, a única espécie representante do gênero *Staphylococcus* com importância em DTA foi o *S. aureus*, no entanto, fatores de virulência como enterotoxinas, hemolisina α , β , δ e γ , leucocidina, toxinas esfoliativas A e B e resistência a alguns antibióticos, também foram identificados no genoma de outras espécies, inclusive de SCN (PODKOWIK et al., 2012). Além disso, SCN também têm sido reportados como causadores de surtos de intoxicação alimentar estafilocócica, que cursa com vômitos e diarreia; e, em alguns casos, náuseas, cólicas abdominais e sudorese (CARMO et al., 2002).

Outro problema preocupante é a resistência aos antimicrobianos apresentada por algumas cepas de SCN. O uso de forma exagerada e indiscriminada dos antimicrobianos em animais, seja para fins profiláticos, terapêuticos ou como suplementação animal pode causar seleção de cepas resistentes (ANDRÉ et al., 2006). Esta situação constitui um risco de saúde pública, visto que os antimicrobianos utilizados em animais são pertencentes às mesmas classes dos utilizados na medicina humana (ARIAS e CARRILHO, 2012), podendo ocasionar, através do consumo de produtos de origem animal, a transmissão de estirpes resistentes (GUIMARÃES, 2011).

O presente estudo teve como objetivo identificar a presença de genes enterotoxigênicos em cepas de SCN isoladas de suínos durante o fluxograma de abate em um frigorífico e avaliar a sensibilidade antimicrobiana dessas cepas.

2. METODOLOGIA

Foram avaliadas 36 cepas de *Staphylococcus* coagulase negativa previamente isoladas de suínos em diferentes pontos do fluxograma de abate de um abatedouro legalmente estabelecido, cadastrado e inspecionado pela Secretaria da Agricultura, Pecuária e Irrigação do Rio Grande do Sul (dados não publicados), sendo cinco cepas do reto, quatro da superfície da língua, seis da superfície da papada, seis da superfície interna da carcaça após a evisceração, quatro da superfície interna dos linfonodos mesentéricos e 11 cepas da superfície externa da meia carcaça antes da entrada na câmara fria. O DNA dos isolados foi extraído de acordo com o protocolo descrito por SAMBROOK E RUSSEL (2001) e após foi realizada a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) conforme CUNHA et al. (2006) com modificações, pesquisando os genes que codificam para as enterotoxinas A (SEA), B (SEB), C (SEC), D (SED) e a toxina da síndrome do choque tóxico (TSST-1).

O perfil de resistência antimicrobiana das cepas confirmadas como enterotoxigênicas foi realizado de acordo com BAUER et al. (1966), pela técnica de disco difusão em Ágar Müller-Hilton (Kasvi, Brasil). Os halos de inibição de crescimento foram medidos e interpretados conforme recomendações do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2015). Os antimicrobianos utilizados foram: ampicilina (30 mcg) (Laborclin, Brasil), cefalotina (30 mcg) (Laborclin), cefoxitina (30 mcg) (Laborclin), enrofloxacina (5 mcg) (Cefar, Brasil), neomicina (30 mcg) (DME, Brasil), penicilina G (10U) (Laborclin), sulfonamida (300 mcg) (Laborclin) e trimetopim (5 mcg) (CECON, Brasil).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pode-se observar que 38,88% (14/36) das cepas carregavam, pelo menos, um gene codificador de enterotoxina, das quais, cinco (35,71%) possuíam o gene *sea*, que codifica a SEA, uma (7,14%) o gene *seb*, codificador da SEB, seis (42,85%) o gene *sec*, que codifica a SEC, sete (50%) o gene *sed*, codificador da SED e cinco (35,71%) o gene *tst*, que codifica a TSST-1. Portanto, os genes mais encontrados foram *sec* e *sed*.

Resultados similares aos nossos foram obtidos por SILVA (2015), que identificou que 43,5% dos SCN isolados de manipuladores de um restaurante universitário apresentavam genes enterotoxigênicos, dos quais *sec* foi detectado em 26,8% das cepas. Alguns autores propõem que a principal fonte de contaminação dos alimentos são os manipuladores, entretanto, pode ocorrer contaminação cruzada provinda de equipamentos e ambientes contaminados (GUSTAFSON et al., 2015). Na literatura, consta que o gene *sea* é o mais prevalente entre as cepas, porque facilmente pode ser disseminado entre *Staphylococcus* spp. e, em decorrência da SEA ser tóxica em baixas concentrações, esta é a toxina mais associada a casos de intoxicação alimentar estafilocócica (BALABAN e RASOOLY, 2000). KARAHAN et al., (2009) sugeriu que a associação do gene *tst* a outros genes enterotoxigênicos, pode aumentar a patogenicidade da cepa. Em nosso estudo, foi identificada a presença de TSST-1 associada com SEC em 4 (28,57%) cepas. Os resultados demonstram o potencial dos SCN encontrados em produtos suínos como causadores de DTA.

Em relação ao perfil de resistência dos isolados frente aos antibióticos testados, foram obtidos os seguintes resultados: Enrofloxacina e sulfonamida com menor resistência, com 6 (42,85%) cepas resistentes, seguido do trimetopim com 9 (64,28%) cepas resistentes; e, posteriormente, ampicilina e cefoxitina, ambos com 10 (71,42%) cepas resistentes. Apresentaram resistência para cefalotina, 12 (85,71%) cepas. Os antibióticos aos quais as cepas testadas apresentaram maior

resistência foram penicilina e neomicina, das quais 13 (92,85%) cepas foram resistentes. Neste trabalho, foram identificadas 10 (71,42%) cepas de SCN resistentes a meticilina. KLIBI et al. (2018) identificaram que 29,41% (20/68) dos isolados de SCN provenientes de leite bovino mastítico eram resistentes a meticilina. Nos últimos anos, houve modificações da epidemiologia das cepas resistentes a meticilina, sendo detectados surtos causados por estas, na qual a origem não está relacionada a hospitais (BAUTE, 2018). E, de acordo com MARIN (2002), a resistência à meticilina confere para as cepas resistência a todos beta-lactâmicos e, também, para grupos de antibióticos como quinonas e aminoglicosídeos. O elevado percentual (71,42%) de cepas resistentes à meticilina encontrado no nosso estudo mostra um cenário preocupante que apresenta riscos para a saúde pública.

4. CONCLUSÕES

Cepas de SCN isoladas de suínos podem conter os genes enterotoxigênicos codificadores das toxinas SEA, SEB, SEC, SED E TSST-1 e podem ser resistentes à meticilina, além de outros antimicrobianos. Estes resultados demonstram que SCN isolados de suínos têm potencial para causar DTA cujo tratamento pode ser problemático em função da resistência das cepas a antimicrobianos. Este estudo é um alerta quanto à demanda de cuidados mais específicos em relação à contaminação de alimentos por SCN.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABPA. Associação Brasileira de Proteína Animal. **Exportação de carne suína**. Acessado em: 04 de set. 2019. Online. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/camaras-setoriais-tematicas/documentos/camaras-setoriais/aves-e-suinos/2018/36a-ro/abpa-aves-ovos-e-suinos.pdf>>.
- ANDRÉ, M. C. D. P. B.; SANTOS, P. P.; CAMPOS, M. R. H.; BORGES, L. J.; SERAFINI, Á. B. Utilização do antibiograma como ferramenta de tipagem fenotípica de *Staphylococcus aureus* isolados de manipuladores, leite cru e queijo minas frescal em laticínio de Goiás. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. p. 102-108, 2006
- ARIAS, M.V.B; CARRILHO, C.M.D.M. Resistência antimicrobiana nos animais e no ser humano. Há motivo para preocupação? Semina: **Ciências Agrárias**, v.33, n.2, p.775-790, 2012.
- BALABAN, N.; RASOOLY, A. *Staphylococcal* enterotoxins (review). **Journal Food Microbiology**. V 61, p. 1-10, 2000.
- BAUER, A. W.; KIRBY, W. M. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 45, p. 493-496, 1966.
- BAUTE, X. F. **Resistencia a β -lactâmico por *Staphylococcus aureus***. 2011. Dissertação (Graduação em Biologia). Universidade de La Laguna, Espanha.
- CARMO, L.S.; DIAS, R.S.; LINARDI, V.R.; SENA, M.J.; SANTOS, D.A.; FARIA, M.E.; PENA, E.C.; JETT, M.; HENEINE, L.G. Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in Minas cheese and raw milk in Brazil. **Food Microbiology**, v. 19, n. 1, p. 9-14, 2002.

- CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. Twenty Fourth Informational Supplement. CLSI document M100-S24. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2015.
- CUNHA, M. D. L. R. D.; PERESI, E.; CALSOLARI, R. A. O.; ARAÚJO JÚNIOR, J. P. Detection of enterotoxins genes in coagulase-negative *staphylococci* isolated from foods. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.37, n.1, p.70-74, 2006.
- GUIMARÃES, F.F. **Perfil de sensibilidade microbiana, pesquisa de gene mecA de resistência à meticilina e detecção molecular de genes codificadores de enterotoxinas, em espécies de estafilococos coagulase positiva e negativa, isolados de mastites bovinas**. 2011. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Botucatu.
- GUSTAFSON, J. E.; MUTHAIYAN, A.; DUPRE, J. M.; RICKE, S. C. *Staphylococcus aureus* and understanding the factors that impact enterotoxin production in foods: A review. **Food Control**. p. 1 – 14, 2015.
- KARAHAN M.; AÇIK M.N.; CETINKAYA, B. Investigation of Toxin Genes by Polymerase Chain Reaction in *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis in Turkey. **Foodborne Pathogens and Disease**. V.6, n.8, p.1029-1035, 2009.
- KLIBI, A., MAAROUFI, A., TORRES, C.; JOUINI, A. Detection and characterization of methicillin-resistant and susceptible coagulase-negative *staphylococci* in milk from cows with clinical mastitis in Tunisia. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 52, n.6, p. 930-935, 2018.
- MACHADO, L.A.; LUCCA, F.; ALVES, J.; POZZOBON, A.; FILHO, I.C. Prevalence and genotyping of pathogenic *Escherichia coli* on carcasses of pigs slaughtered in commercial slaughterhouses in southern region of Brazil. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v.8, n.1, p. 128 – 145, 2014.
- MARIN M. Resistencia del *Staphylococcus* a la meticilina. **Medicina (Buenos Aires)**, v.62, n.2, p. 30-5, 2002.
- OLIVEIRA, A. **Biofilme estafilocócico: prevenção, detecção da produção e determinação do perfil de resistência a antimicrobianos**. 2014. 143f. Dissertação (Doutorado em Biologia). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu.
- PODKOWIK, M.; BYSTRON, J.; BANIA, J. Genotypes, antibiotic resistance, and virulence factors of *staphylococci* from ready-to-eat food. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 9, n. 1, p. 91–93, 2012.
- ROÇA, R.O. **Composição Química da Carne**. Botucatu: FCA-UNESP, p.10, 2000.
- SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- SILVA, S. S. P. **Genes para enterotoxinas em *Staphylococcus* sp. isolados de manipuladores de alimentos de um restaurante universitário na cidade do Natal-RN**. 2015. Dissertação (Mestrado em Biologia). Universidade Federal do Rio Grande do Norte.
- WILFRED R. S.; NARENDRA B. R.; PORTEEN K.; RAJA P.; TMA S.; PERIA K.; VELURU A. R. Prevalence, antimicrobial susceptibility and virulence genes of *Staphylococcus aureus* isolated from pork meat in retail outlets in India. **Journal of Food Safety**. v. 39, 2019.
- ZHANEL, G. G.; HISANAGA, T. L.; LAING, N. M.; DECORBY, M. R.; NICHOL, K. A.; WESHNOWESKI, B.; JOHNSON J.; NOREDDIN, A.; LOW, D.E.; KARLOWSKY, J.A.; HOBAN, D. J. Antibiotic resistance in *Escherichia coli* outpatient urinary isolates: final results from the North American Urinary Tract Infection Collaborative Alliance (NAUTICA). **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.27, n. 6, p. 468-475, 2006.