



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA



SIDNEY JOSÉ DOS SANTOS

**DETECÇÃO DE GENES QUE CODIFICAM PARA ENTEROTOXINAS  
PRODUZIDAS POR *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ISOLADOS DE LEITE DE  
TANQUES EXPANSÃO COMUNITÁRIOS EM ALAGOAS**

RIO LARGO

2014

SIDNEY JOSÉ DOS SANTOS

**DETECÇÃO DE GENES QUE CODIFICAM PARA ENTEROTOXINAS  
PRODUZIDAS POR *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ISOLADOS DE LEITE DE  
TANQUES EXPANSÃO COMUNITÁRIOS EM ALAGOAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia do Centro de Ciências Agrárias, da Universidade federal de Alagoas, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Zootecnia.

ORIENTADORA:  
Prof. Dr. Elizabeth Sampaio de Medeiros

CO-ORIENTADOR:  
Prof. Dr. Fábio Luiz Fregadolli

RIO LARGO

2014

**Catálogo na fonte**  
**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca Central**  
**Divisão de Tratamento Técnico**  
**Bibliotecário Responsável: Roselito de Oliveira Santos**

S237d Santos, Sidney José dos.  
Detecção de genes que codificam para enterotoxinas produzidas por *Staphylococcus aureus* isolados de leite de tanques de expansão comunitários em Alagoas / Sidney José dos Santos. – Rio Largo, 2014.  
48f. : il., graf., tabs.

Orientadora: Elizabeth Sampaio Medeiros.  
Coorientador: Fábio Luiz Fregadolli.

Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Alagoas. Centro de Ciências Agrárias, Rio Largo, 2014.

Bibliografia: f. 45-48.

1. Leite - Contaminação. 2. *Staphylococcus aureus*. 3. Intoxicação alimentar. 4. Toxinas. I. Título.

CDU: 637.13

## TERMO DE APROVAÇÃO

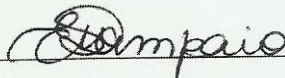
SIDNEY JOSÉ DOS SANTOS

### DETECCÇÃO DE GENES QUE CODIFICAM PARA ENTEROTOXINAS PRODUZIDAS POR "STAPHYLOCOCCUS AUREUS" ISOLADOS DE LEITE DE TANQUES EXPANSÃO COMUNITÁRIOS DE ALAGOAS

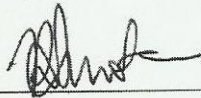
Esta dissertação foi submetida a julgamento como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Zootecnia, outorgado pela Universidade Federal de Alagoas.

A citação de qualquer trecho desta dissertação é permitida, desde que seja feita de conformidade com as normas da ética científica.

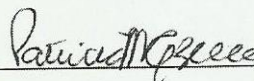
Aprovado em 31/10/2014



Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Elizabeth Sampaio de Medeiros  
Orientadora (UFRPE)



Prof. Dr. Rinaldo Aparecido Mota  
Membro (UFRPE)



Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Patrícia Mendes Guimarães Beelen

Rio Largo – AL

2014

Este trabalho é dedicado primeiramente a Deus que até aqui me ajudou com sua mão poderosa que sempre está estendida sobre mim.

A minha mãe, Expedita Maria e ao meu pai José Ulisses que juntos acompanharam todos os meus passos e formaram o meu caráter, e por serem o meu sustentáculo.

A minha esposa pelo amor, pela paciência e por ter me dado força e orado por mim durante a minha caminhada e ao meu filho.

Dedico

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente a Deus que é o meu orientador por excelência que me ajudou em todos os momentos.

A minha a minha esposa que com amor esteve comigo me ajudando durante a minha caminhada e ao meu filho.

A minha professora e orientadora Elizabeth Sampaio, por ter se disponibilizado a me ajudar com seu conhecimento e por me acolher durante os dias que passei em Recife.

Aos meus colegas de sala que compartilharam comigo todas as vitórias e dificuldades durante o mestrado.

Aos professores que se dedicaram a me ensinar, aos amigos que me ajudaram no desenvolvimento da minha pesquisa em especial, a Karla, Atzel e alison que não mediram esforços para me ajudar.

Aos meus irmãos em Cristo que me ajudaram em oração.

“Se ouvires atentamente a voz do Senhor teu Deus, tendo cuidado de guardar todos os seus mandamentos que eu hoje te ordeno, o Senhor teu Deus te exaltará sobre todas as nações da terra.”

**Deuteronômio 28:1**

## RESUMO GERAL

A contaminação do leite *in natura* por *Staphylococcus aureus* é uma preocupação de saúde pública devido o seu potencial em produzir enterotoxinas e fatores de virulência. Objetivou-se com esse estudo detectar genes que codificam para enterotoxinas produzidas por *Staphylococcus aureus* isolados de leite cru proveniente de tanques de expansão comunitários no Estado de Alagoas. As estirpes foram cedidas pelo laboratório de Inspeção de Leite e Derivados da Universidade Federal de Alagoas. As 39 amostras foram anteriormente submetidas a provas bioquímicas dentre elas o teste da coagulase e posteriormente identificadas e armazenadas à -20°C. Foram reativadas e submetidas à reação em cadeia polimerase (PCR) utilizando primers específicos. Dentre as 39 estirpes de *Staphylococcus* coagulase positiva submetidas à pesquisa do gene Nuc, 69,2% (27/39) foram identificados como *Staphylococcus aureus* pela técnica da (PCR). Das 27 amostras de *Staphylococcus aureus* submetidos à pesquisa de enterotoxinas clássicas Seb, Sec e See e as novas toxinas Seh e Sei, 18,51% (5/27) foram positivas para gene de enterotoxinas, sendo que os fragmentos de genes envolvidos na síntese de enterotoxinas clássicas Seb, Sec e See e as novas toxinas Sei, não foram amplificados em nenhum dos isolados, apenas fragmentos de gene envolvido na síntese Seh foi amplificado. Os fragmentos dos genes envolvidos na síntese de  $\alpha$ -hemolisina amplificaram 81,5% (22/27). E para  $\beta$ -hemolisina amplificaram 51,8% (14/27). Conclui-se com esse estudo, que o alto percentual de *Staphylococcus aureus* com a presença de genes capaz de produzir enterotoxinas estafilocócicas encontradas no leite cru, é um indicativo de riscos para saúde pública, devido o seu potencial para a produção de enterotoxinas termoestáveis que não são eliminadas durante os processos térmicos da indústria, podendo causar intoxicação alimentar. *Staphylococcus aureus* com a presença do gene capaz de produzir as enterotoxinas estafilocócicas no leite cru indica uma alta probabilidade de produção da mesma.

**Palavras-chaves:** Saúde pública, PCR, Toxinas, Termoestabilidade



## ABSTRACT GENERAL

The contamination of fresh milk by *Staphylococcus aureus* is a public health preoccupation due to their potential to produce enterotoxin and virulence factors. The objective of this study was to detect genes encoding for enterotoxins produced by *Staphylococcus aureus* isolates from raw milk from expansion of community in the State of Alagoas tanks. The strains were provided by the laboratory of Milk and Dairy Products Inspection, Federal University of Alagoas. The 39 samples were previously subjected to biochemical tests among them the coagulase test and subsequently identified and stored at -20°C. Were reactivated and subjected to polymerase chain reaction (PCR) using specific primers. Among the 39 strains of coagulase positive *Staphylococcus* undergoing research Nuc gene, 69.2% (27/39) were identified as *Staphylococcus aureus* by PCR technique. Of the 27 samples of *Staphylococcus aureus* enterotoxin underwent investigation of classical (Seb), (Sec) and (See) and new toxins (Seh) and (Sei), 18.51% (5/27) were positive for enterotoxin gene, and fragments of genes involved in the synthesis classical enterotoxins Seb, Sec and See and the new toxins Sei were not amplified in any of the isolates, only fragments of the gene involved in the synthesis Seh was amplified. Fragments of the genes involved in the synthesis of  $\alpha$ -hemolysin amplify 81.5% (22/27). And for  $\beta$ -hemolysin amplified 51.8% (14/27). This study concluded that the high percentage of *Staphylococcus aureus* with the presence of gene capable to produce staphylococcal enterotoxins found in raw Milk is a indicative of risks to public health due to their potential to produce thermostable enterotoxin that are not eliminated during the industrial thermal process and could food poisoning. *Staphylococcus aureus* with the presence of gene capable of producing staphylococcal enterotoxins in raw milk, indicating a high probability of producing the same.

**Keywords:** Public health, PCR, Toxin, Thermostability

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1</b> - NÚMERO DE SURTOS POR AGENTE ETIOLÓGICO ENTRE 2000 E 2011 REPORTADOS PELO MINISTÉRIO DA SAÚDE. FONTE: SVS/MS.....	20
<b>FIGURA 2</b> - DIVISÃO DO ESTADO EM MESORREGIÕES COM OS MUNICÍPIOS QUE PARTICIPARAM DO ESTUDO. ....	36
<b>FIGURA 3</b> - ELETROFORESE EM GEL AGAROSE A 2% DOS PRODUTOS DE AMPLIFICADOS POR PCR, PARA DETECÇÃO DO GENE NUC EM ISOLADOS DE <i>STAPHYLOCOCCUS</i> COAGULASE POSITIVA. C+ = CONTROLE POSITIVO C- = CONTROLE NEGATIVO. ....	39
<b>FIGURA 4</b> - ELETROFORESE EM GEL AGAROSE A 2% DOS PRODUTOS DE AMPLIFICADOS POR PCR, PARA DETECÇÃO DO GENE HLA EM ISOLADOS DE <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> . C+ = CONTROLE POSITIVO C- = CONTROLE NEGATIVO.....	41
<b>FIGURA 5</b> - ELETROFORESE EM GEL AGAROSE A 2% DOS PRODUTOS DE AMPLIFICADOS POR PCR, PARA DETECÇÃO DO GENE HLB EM ISOLADOS DE <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> . C+ = CONTROLE POSITIVO C- = CONTROLE NEGATIVO.....	42

## **LISTA DE TABELAS**

<b>TABELA 1</b> - OLIGONUCLEOTÍDEOS UTILIZADOS NA AMPLIFICAÇÃO DOS GENES.....	38
<b>TABELA 2</b> - DETECÇÃO DE GENES (SEH) EM ESTIRPES DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS ISOLADOS DE LEITE DE TANQUES DE EXPANSÃO COMUNITÁRIOS DO ESTADO DE ALAGOAS. ....	40

## LISTA DE ABREVIATURAS

**BHI** – Infusão de cérebro e coração

**DNTP** – Desoxirribonucleótidos trifosfato

**DNA** – Ácido desoxirribonucléico

**DTA** – Doenças transmitida por alimentos

**DVA** – Doenças veiculada por alimentos

**EDTA** – Ácido etilenodiamino tetra-acético

**EE** – Enterotoxina Estafilocócica

**HLA** – Toxina  $\alpha$ -hemolisina

**HLB** – Toxina  $\beta$ -hemolisina

**MgCl<sub>2</sub>** – Cloreto de magnésio

**NUC** – Nuclease

**PCR** – Reação em cadeia polimerase

**SEB** – Enterotoxina estafilocócica B

**SEC** – Enterotoxina Estafilocócica C

**SEE** – Enterotoxina Estafilocócica E

**SEH** – Enterotoxina Estafilocócica H

**SEI** – Enterotoxina Estafilocócica I

**SCP** – *Staphylococcus* Coagulase Positiva

**SCN** – *Staphylococcus* Coagulase Negativa

**TAE** – Tris-Acetato-EDTA

**UFC** – Unidade formadora de colônia

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>11</b>
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>12</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	12
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	12
<b>3 REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>13</b>
3.1 LEITE IN NATURA .....	13
3.2 STAPHYLOCOCCUS SPP. ....	14
3.2.1 <i>Staphylococcus coagulase positiva</i> .....	15
3.2.2 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	16
3.3 MASTITE POR STAPHYLOCOCCUS AUREUS .....	17
3.4 ENTEROTOXINAS ESTAFILOCÓCICAS .....	18
3.5 INTOXICAÇÃO ESTAFILOCÓCICA.....	19
3.6 REAÇÃO EM CADEIA POLIMERASE (PCR).....	21
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>23</b>
<b>5 ARTIGO: DETECÇÃO DE GENES QUE CODIFICAM PARA ENTEROTOXINAS PRODUZIDAS POR STAPHYLOCOCCUS AUREUS ISOLADOS DE LEITE DE TANQUES EXPANSÃO COMUNITÁRIOS EM ALAGOAS .....</b>	<b>33</b>
5.1 INTRODUÇÃO .....	35
5.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	36
5.2.1 <i>Origem dos isolados</i> .....	36
5.2.2 <i>Reativação das culturas bacterianas do estoque</i> .....	37
5.2.3 <i>Extração do (DNA) molecular</i> .....	37
5.2.4 <i>Amplificação</i> .....	37
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
5.4 CONCLUSÃO .....	43
REFERÊNCIAS .....	44

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil é o quarto maior produtor mundial de leite, com uma produção de 32,304.421 toneladas 8,7 % da produção mundial, ficando atrás dos Estados Unidos, Índia e China (FAO, 2013).

O Estado de Alagoas é o sexto maior produtor da região Nordeste ficando abaixo da Bahia, que tem o maior rebanho com 10,2 milhões de cabeça, de Pernambuco, do Ceará, do Maranhão e de Sergipe (BRASIL, 2011).

No entanto as características de produção de leite no país dificultam o desenvolvimento da atividade, pois, por serem pequenos produtores, geralmente investem pouco na atividade, possuem baixo conhecimento técnico, com falta de controle sanitário dos animais e pouca higiene durante a ordenha, conservação e transporte, podendo resultar em baixa qualidade da matéria-prima. (NERO et al., 2009),

A principal norma referente à legislação sanitária federal sobre a produção de leite é a Instrução Normativa nº 62 (IN62), do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, publicada em novembro de 2011, que tem como objetivo melhorar a qualidade do leite oferecido aos consumidores no Brasil e no exterior. Esta normativa trata dos aspectos referentes à obtenção higiênica do leite e estabelece padrões para todas as classificações e comercialização do leite com base no controle da qualidade (BRASIL, 2011).

Guido et al. (2010) enfatizam que contagens microbianas elevadas em leite cru são provenientes de problemas de deficiência na lavagem e sanitização dos equipamentos e utensílios, falta de higiene na ordenha e sistema de resfriamento inadequado.

*Staphylococcus aureus* é considerado o principal patógeno humano, mas também está associado com uma variedade de doenças animais, reconhecido mundialmente como um dos principais patógenos causadores de mastites em vacas leiteiras (FREITAS, et al., 2014).

A contaminação do leite cru por bactérias do gênero *Staphylococcus* enterotoxigênicos representa uma das principais fontes de surtos de intoxicação alimentar, tornando-se assim um risco para saúde pública.

Justifica-se a realização desse estudo devido à importância social quanto às enterotoxinas formadas a partir dos *Staphylococcus aureus*, pois, as mesmas resistem aos tratamentos térmicos da indústria e causam como consequência transtornos à saúde do consumidor.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Detectar genes que codificam *Staphylococcus aureus* e enterotoxinas clássicas Seb, Sec e See, Seh e Sei no leite de tanques de expansão comunitários no Estado de Alagoas.

### 2.2 Objetivos específicos

- ✓ Realizar a caracterização morfológica de colônias típicas de *Staphylococcus aureus* para confirmação do grau de pureza e extração do DNA para PCR;
- ✓ Identificar a prevalência de *Staphylococcus aureus* com genes que codificam enterotoxinas;
- ✓ Caracterização de enterotixinas encontradas no leite de tanques de expansão no estado de Alagoas;
- ✓ Detectar presença de gene que codificam fatores de virulência em *Staphylococcus aureus*;
- ✓ Fornecer subsídios técnico-científico às secretarias de saúde e vigilância sanitária.

## 3 REVISÃO DE LITERATURA

### 3.1 LEITE *IN NATURA*

Entende-se por leite, sem outra especificação, o produto oriundo da ordenha completa e ininterrupta, em condições de higiene, de vacas saudáveis, bem alimentadas e descansadas. O leite de outros animais deve denominar-se segundo a espécie de que proceda. (BRASIL, 2011).

De acordo com Rezer (2010), a importância do leite sob o ponto de vista nutricional se deve a qualidade de suas proteínas, que são divididas em caseínas ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\kappa$ ) e proteínas do soro (albumina,  $\alpha$ -lactoalbumina,  $\beta$ -lactoglobulina, imunoglobulinas e proteose-peptonas), ao seu teor elevado em cálcio, fósforo, magnésio, vitamina A, riboflavina e niacina.

O leite é um alimento rico em lipídeos, carboidratos, proteínas, minerais e vitaminas, podendo ser considerado um alimento completo e de grande importância para o desenvolvimento do ser humano (SILVA, 2010).

A produção de leite em Alagoas é a segunda atividade econômica mais importante do Estado, perdendo apenas para a cana-de-açúcar, e se concentra na bacia leiteira do Estado, no sertão e agreste alagoano (DANTAS, 2011). No Brasil, de modo geral, o leite é obtido sob condições higiênico-sanitárias deficientes e em consequência, apresenta elevados números de micro-organismos, o que constitui um risco à saúde da população, principalmente quando consumido sem tratamento térmico (SOUZA, 2010).

O consumo de leite cru é uma preocupação de saúde pública, pois o produto pode veicular uma série de doenças transmitidas por alimentos, se for obtido e manipulado em condições inadequadas (MONTANHINI e HEIN, 2013). Considerado um excelente substrato, muitos micro-organismos patogênicos podem ser veiculados ao homem através do consumo de leite e seus derivados, entre eles *Staphylococcus* spp. (SILVA, 2012)

Foi demonstrada a presença de vários tipos de micro-organismos patogênicos (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* spp, *Corynebacterium bovis*, *Streptococcus agalactiae* e *Staphylococcus* spp) em amostras de leite de pequenas propriedades no Estado de São Paulo (RIBEIRO et al., 2009).



Assim, o leite e produtos lácteos podem levar a surtos de intoxicação alimentar, causados por uma variedade de micro-organismos que encontram um meio ideal de crescimento (WINCK et al., 2010).

Esses fatores de virulência podem ser produzidos tanto por isolados de *Staphylococcus aureus* no leite de vacas com mastite clínica como na forma subclínica (ARGUDIN et al., 2010).

A contaminação do leite por patógenos é realidade no Brasil e tem importância na produção animal e na saúde pública (DIEDRICH, et al., 2013). É de extrema importância que o leite seja obtido dentro dos padrões de qualidade. Por se tratar de um alimento completo, rico em proteínas, vitaminas, gordura, carboidratos e sais minerais, torna-se uma fonte importante de nutrientes acessível para o homem. (MARTINS e ANDRADE, 2011).

### **3.2 STAPHYLOCOCCUS SPP.**

Atualmente, existem 47 espécies e 24 subespécies de *Staphylococcus* e são divididos em dois grupos baseado na habilidade de coagular o plasma: *Staphylococcus* coagulase positiva (SCP) e *Staphylococcus* coagulase negativa (SCN) (ELZÉBY, 2013). *Staphylococcus* coagulase positiva são micro-organismos de importância em alimentos por apresentarem risco para saúde pública pela produção de enterotoxinas (PINTO, et al., 2011).

*Staphylococcus* spp. são os agentes mais frequentemente isolados em rebanhos leiteiros, representando grande importância epidemiológica e clínica nas mastites bovinas associadas a falhas no manejo na ordenha, bem como, na prevenção e diagnóstico da mastite contagiosa dos rebanhos, uma vez que a transmissão dos agentes causadores ocorre predominantemente durante a ordenha, já que o reservatório de microrganismos desse gênero é a glândula mamária (ANDRADE, et al., 2009).

De acordo com Correa, et al., (2009), este grupo microbiano é provavelmente carregado para o leite a partir das infecções da glândula mamária. O patógeno é veiculado pelo leite contaminado de animais sujeitos a mastite e manipulação excessiva e contaminação cruzada de diferentes alimentos (ARGUDIM, 2010).

No Brasil, 8.663 surtos de intoxicação alimentar foram reportados pelo Ministério da Saúde entre 2000 e 2011, sendo que a maior parte deles aconteceu nas residências. *S. aureus* foi o segundo maior causador destas intoxicações, envolvido em 799 surtos no período (BRASIL, 2013).

Do total de surtos, 350 foram causados pelo consumo de leite e derivados contaminados. Ainda no Brasil, 40% dos produtores de leite não são inspecionados (Nero et al., 2008), e a produção ocorre sem controle dos processos térmicos possibilitando o crescimento de patógenos (ORTOLANI et al., 2010).

Entre os patógenos, *Staphylococcus aureus* é um dos mais abundantes isolados do leite cru brasileiro (OLIVEIRA et al., 2011). Ferreira et al. (2011) avaliaram 20 amostras de queijo tipo Minas frescal comercializados em Uberlândia (MG), encontrando 18 amostras com enumeração de SCP entre  $1,7 \times 10^3$  e  $2,6 \times 10^5$  UFC/g.

Viçosa et al. (2010) avaliaram 30 amostras de leite cru e 35 de queijo Minas frescal produzidas com leite cru comercializados em Viçosa (MG), utilizando diferentes métodos de plaqueamentos, resultados usando Baird-Parker indicaram cerca de 50% das amostras SCP, com enumeração média de 4,61 log UFC/mL em leite e 5,11 log UFC/g em queijo.

Na Suécia, Rosengren et al. (2010) encontraram 69% de amostras de queijos produzidos de leite cru e 29% de leite pasteurizado com presença de SCP, 97% foram confirmados como *Staphylococcus aureus*. Na Etiópia Makita et al., (2012) encontraram *Staphylococcus aureus* em leite cru com enumeração média de  $1 \times 10^{-2}$  de dose de 100 ng em 500 mL de leite.

Neste gênero estão incluídas espécies produtoras de enterotoxinas termoestáveis, de grande relevância a saúde pública, as quais fazem parte do grupo denominado por *Staphylococcus coagulase positiva*. Dentre estas há de se destacar *Staphylococcus aureus* (FIGUEIREDO, et al., 2014).

### **3.2.1 *Staphylococcus coagulase positiva***

*Staphylococcus coagulase positiva*, em especial o *Staphylococcus aureus* são os principais agentes etiológicos da mastite, infecção da glândula mamária, e cepas dessa bactéria podem produzir enterotoxinas capazes de causar toxinfecções alimentares (SANTANA et al., 2010).

Além disto, estas bactérias podem ter acesso ao leite ainda no ambiente intramamário, tendo em vista que algumas espécies são agentes etiológicos da mastite clínica e subclínica (BANDEIRA et al., 2013).

Não existem padrões para a presença de *Staphylococcus* coagulase positiva no leite cru. Porém, a presença de um elevado número dessas bactérias indica perigo potencial para a saúde pública, devido à enterotoxina estafilocócica, que é termorresistente (GUIDO et al., 2010).

Embora o Ministério da Saúde não estabeleça padrão microbiológico para *Staphylococcus* coagulase positiva no leite *in natura*, a presença do patógeno nos alimentos a partir de  $1 \times 10^5$  UFC/mL têm importância epidemiológica por favorecer a produção de enterotoxinas estafilocócica sob condições ambientais adequadas e, com isso, propiciar uma intoxicação alimentar, sendo que 0,375 µg da enterotoxina estafilocócica.Kg-1 corpóreo é suficiente para causar um quadro de intoxicação (FRANCO e LANDGRAF, 2008).

A presença de espécies coagulase positiva como *Staphylococcus aureus* em alimentos é comum, principalmente por se tratar de um micro-organismo que está em contato freqüente com o homem e os animais, e pode facilmente desencadear surtos de intoxicações alimentares (DIEDRICH et al., 2013).

Além das enterotoxinas, algumas enzimas são produzidas, como fatores de virulência, por determinadas espécies de *Staphylococcus* spp. e são utilizadas no diagnóstico laboratorial para identificação deste gênero microbiano ou de suas espécies. Entre estas enzimas, destacam-se a catalase, a termonuclease e a coagulase. A catalase atua inativando o peróxido de hidrogênio e radicais livres tóxicos formados pelo sistema mieloperoxidase no interior das células fagocitárias e é utilizada para diferenciar *Staphylococcus* de *Streptococcus*. A proteína coagulase é um importante fator de virulência de *S. aureus*, pois é capaz de promover a coagulação do plasma sanguíneo (GHARIB et al., 2013)

### **3.2.2 *Staphylococcus aureus***

*Staphylococcus aureus*, pertencente é uma bactéria esférica do grupo de cocos Gram positivos. Pode existir como comensal do organismo humano, integrando a microbiota da pele, de membranas mucosas e de outros sítios anatômicos (FREITAS et al., 2014).

São bactérias mesófilas com temperatura de crescimento na faixa de 7°C a 47,8°C. A produção de toxinas ocorre entre 10°C e 46°C. Os limites de pH estão entre 4,2 e 9,3 e a atividade de água mínima é de 0,85 suportando concentrações de até 25% de NaCl (FRANCO e LANDGRAF, 2008; SILVA et al., 2010).

É considerado o principal patógeno humano, mas também está associado com uma variedade de doenças animais, reconhecido mundialmente como um dos principais patógenos causadores de mastites em vacas leiteiras (FREITAS, et al., 2014).

*Staphylococcus aureus* é um dos agentes etiológicos mais comuns de doenças bacterianas em todo o mundo devido à sua capacidade de produzir uma ampla gama de exotoxinas e outros fatores de virulência (FUSCO et al., 2011).

Em geral as intoxicações são causadas quando o micro-organismo apresenta uma quantidade superior a  $10^5$  UFC/g do alimento (COSTA e DIAS, 2013).

A contaminação por micro-organismos dentre eles *Staphylococcus aureus* está relacionada com as deficiências da cadeia leiteira, compreendendo do manejo e higiene durante a ordenha a problemas sanitários como a mastite, além da falta de pessoal treinado para a execução do processo (BELOTTI et al., 2011).

### **3.3 MASTITE POR *STAPHYLOCOCCUS AUREUS***

A enfermidade em bovinos pode ser causada por aproximadamente 137 espécies de micro-organismos pertencentes a 35 gêneros, sendo a bactéria com maior prevalência e de principal relevância *Staphylococcus aureus*, o qual sua contaminação e disseminação ocorrem durante a ordenha (CAPURRO et al., 2010; MICHEL et al., 2011, KEEFFE, 2012).

Este patógeno é causador de mastite do tipo contagiosa, sendo comumente disseminado de vacas infectadas para vacas sadias durante a ordenha (MICHEL et al., 2011). A participação da espécie *Staphylococcus aureus*, um patógeno que pode ser rotineiramente encontrado no úbere de bovinos, merece destaque como importante espécie causadora de mastite (BADOSH e MELO, 2011).

Para Riekerink et al. (2010), o isolamento de *Staphylococcus aureus* de leite de tanques é um provável indicativo de prevalência de infecções intramamárias no rebanho leiteiro. Esses fatores de virulência podem ser produzidos tanto por isolados de *Staphylococcus aureus* no leite de vacas com mastite clínica como na forma subclínica (ARGUDIN et al., 2010).

*Staphylococcus aureus* isolados de mastite clínica ou subclínica podem produzir enterotoxinas termoestáveis, responsáveis pelo desenvolvimento de enterotoxemia devido à ingestão destas, inclusive em leite pasteurizado (ARGUDIN et al. 2010; UNAL et al., 2012).

A elevada ocorrência de patógenos contagiosos, como o *Staphylococcus aureus* se deve a deficiências nas práticas de manejo, higiene e terapêutica, e em especial, a desinfecção pós ordenha dos tetos (MARTINS et al., 2010).

Os prejuízos causados pela mastite incluem os custos de diagnóstico microbiológico, medicamentos, mão de obra, descarte de leite, redução da produção de leite em razão da mastite clínica e subclínica, descarte do animal ou perda do quarto mamário, risco de transmissão da infecção para outras vacas, além do risco de veiculação de patógenos aos alimentos (SANTOS et al., 2011, KEFEE, 2012).

### 3.4 ENTEROTOXINAS ESTAFILOCÓCICAS

Enterotoxinas estafilocócicas são proteínas extracelulares de baixo peso molecular, hidrossolúveis e resistentes à ação de enzimas proteolíticas do sistema digestivo, permanecendo ativas após a ingestão. Outra característica importante é sua termoestabilidade, sendo capaz de resistir a tratamentos térmicos, como a pasteurização e a ultrapasteurização (SENGER e BIZANI, 2011).

Enterotoxinas estafilocócicas (EE), produzidas por algumas cepas de *Staphylococcus aureus*, causam uma das doenças mais comuns transmitidas por alimentos, a intoxicação alimentar estafilocócica. Essa intoxicação é resultante do consumo de alimentos ou bebidas contendo a dose infectante de uma ou mais (EE) pré-formadas no alimento (BASTOS, 2013). Além de possuírem habilidade para provocar emese e gastroenterite (PINCHUK et al., 2010).

Os sintomas clássicos da intoxicação alimentar estafilocócica são náuseas, vômitos, câibras abdominais geralmente muito dolorosas, diarreia e sudorese. Podem ocorrer, ainda, dores de cabeça, calafrios, queda de pressão arterial e, em raríssimas vezes, febre, quando a quantidade de toxina ingerida é grande (FRANCO e LANDGRAF, 2008).

As principais exotoxinas produzidas por *Staphylococcus* são as enterotoxinas (SE), responsáveis pela intoxicação alimentar estafilocócica no homem, a toxina-1 da síndrome do choque tóxico (TSST-1), responsável pela Síndrome do Choque Tóxico e as Toxinas Esfoliativas, responsáveis pela Síndrome Estafilocócica da Pele Escaldada (Andrade, 2008).

Segundo Senger e Bizani (2011), as enterotoxinas são nomeadas com as letras do alfabeto de acordo com a ordem cronológica de suas descobertas. As enterotoxinas estafilocócicas são classificadas como superantígenos, os quais tem a capacidade de estimular populações de células T, levando a produção de grandes quantidades de citocinas.

Pelo menos 20 superantígenos estafilocócicos sorologicamente distintos já foram descritos até o momento e incluem enterotoxinas denominadas de (EEA a EEV) e toxina da síndrome do choque tóxico (TSST-1) (Pinchuk, Beswick et al., 2010). Sendo que as EEs clássicas (EEA, EEB, EEC, EED e EEE) são as mais estudadas e responsáveis por aproximadamente, 95% dos casos/surtos (AL-TARAZI et al., 2009, JOHLER e STEPHAN, 2010, WALLIN-CARLQUIST et al., 2010).

O potencial de virulência dos diferentes isolados de *Staphylococcus aureus* é determinado pela presença ou ausência de genes de fatores de virulência, como genes que codificam enterotoxinas estafilocócicas, leucocidinas, exfoliatinas, hemolisinas e outras exotoxinas (SPANU et al., 2012).

As principais funções das exotoxinas são: mediar aderência do micro-organismo ao tecido lesionado, a matriz tecidual ou à superfície das células do hospedeiro; facilitar a destruição tecidual e a disseminação do micro-organismo; promover a captura do ferro; auxiliar na evasão de anticorpos e respostas imunes mediadas pelo sistema complemento, incluindo a ação dos fagócitos e promover lise da célula do hospedeiro (GRUMANN et al., 2013).

As enterotoxinas estafilocócicas (EEs) são potentes exotoxinas sintetizadas por espécies de *Staphylococcus* durante a fase logarítmica de crescimento ou durante a transição da fase exponencial para a fase estacionária, contudo, estima-se que sejam necessárias entre  $10^5$  e  $10^6$  unidades formadoras de colônias (UFC) da bactéria por grama de alimento para que a toxina seja formada em níveis capazes de provocar intoxicação alimentar (FRANCO e LANDGRAF, 2008).

### **3.5 INTOXICAÇÃO ESTAFILOCÓCICA**

A segurança alimentar é de fato, de grande importância para a manutenção da saúde pública e apesar de práticas e sistemas de monitoramento avançados em vários países, as DVA's ou surtos de doenças transmitidas por alimentos continuam a ser comuns (THAKUR et al., 2009).

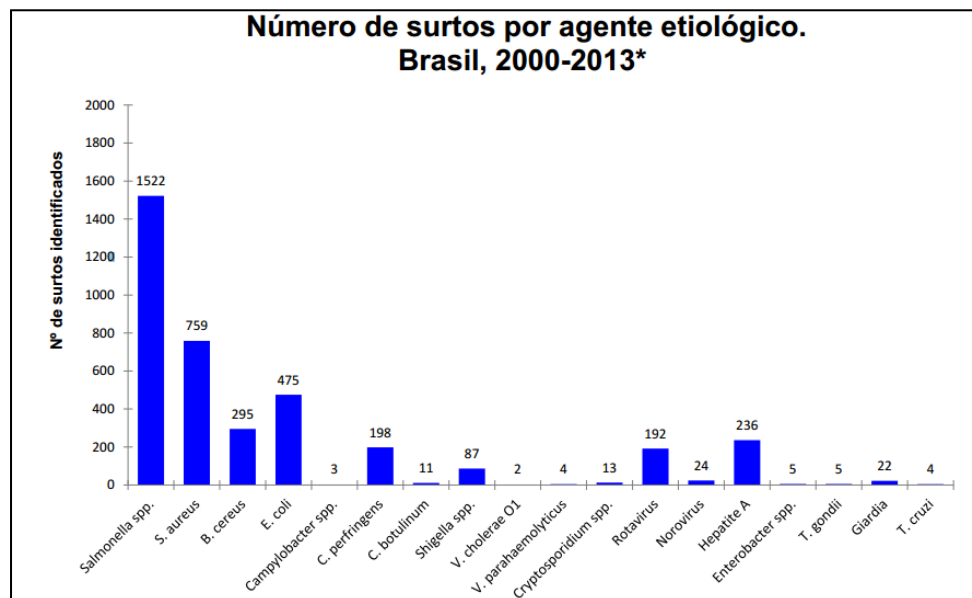
As doenças transmitidas por alimentos (DTAs) são consideradas um grande problema para a saúde pública (SANTANA et al., 2010). A intoxicação causada por *Staphylococcus aureus* manifesta-se logo após a ingestão do alimento contaminado com enterotoxinas pré-formadas. Franco & Landgraf (2008).

No Brasil, estudo realizado no estado da Paraíba, dados da vigilância epidemiológica do estado revelam que o agente etiológico veiculado em 50% dos casos de queijos contaminados foi *Staphylococcus aureus* (RUWER et al., 2011).

Entre os alimentos envolvidos em surtos e casos de intoxicação estafilocócica, leite cru, leite pasteurizado e queijos são os produtos lácteos mais incriminados sendo *S. aureus* o agente etiológico mais frequente nas investigações epidemiológicas (DORES et al., 2013)

A contaminação dos alimentos ocorre normalmente no momento da manipulação direta dos alimentos por indivíduos portadores assintomáticos ou por indivíduos que possuem algum tipo de infecção, geralmente cutânea (TEIXEIRA et al., 2008). A intoxicação causada por *Staphylococcus aureus* manifesta-se logo após a ingestão do alimento contaminado com enterotoxinas pré-formadas. Franco & Landgraf (2008). É necessário menos de 1 mg de toxina pura para desencadear os sintomas característicos da intoxicação estafilocócica, como vômitos e diarreia (LAMAITA et al., 2005).

Quase nove (9) mil surtos de intoxicação alimentar foram reportados ao Ministério da Saúde (MS) entre 2000 e 2011. *Salmonella* spp e *Staphylococcus aureus* estão entre os principais agentes envolvidos em tais intoxicações (Brasil, 2013) (Figura 1).



**Figura 1 - Número de surtos por agente etiológico entre 2000 e 2011 reportados pelo Ministério da Saúde. Fonte: SVS/MS.**

Nos Estados Unidos em casos de surtos alimentares a enterotoxina estafilocócica é comumente isolada, sendo relatados anualmente em média 185.000 casos (MUSTAFA el al., 2009). *Staphylococcus aureus* é referenciado como a quinta causa de DTA em todos os surtos identificados na Europa (EFSA, 2011).

*Staphylococcus aureus* é, entre as bactérias do gênero *Staphylococcus*, a espécie mais relacionada a casos e/ou surtos de intoxicação alimentar, os quais são causados pelas enterotoxinas estafilocócicas (BASTOS, 2013).

Os sintomas mais comuns da intoxicação provocada por *Staphylococcus aureus* são vômito e diarreia que se manifestam entre duas a seis horas após a ingestão da toxina (OBESO et al., 2010).

### **3.6 REAÇÃO EM CADEIA POLIMERASE (PCR)**

Desenvolvida por Kary Banks Mullis (prêmio Nobel de química de 1993 pelo desenvolvimento dessa técnica) em abril de 1983, essa técnica de biologia molecular consiste na síntese enzimática de cópias de ácidos nucleicos. A técnica de biologia molecular por PCR promove, *in vitro*, por meio de artifícios de variação de temperatura, o que o organismo realiza naturalmente, em condições fisiológicas – a duplicação de cadeias de DNA, envolvendo nucleotídeos, sequências iniciadoras (primers) e enzima polimerases. Assim, é possível a obtenção de muitas cópias de uma sequência específica de ácido nucleico, a partir de uma fita molde (COSTA, 2010).

O princípio da PCR envolve três etapas básicas por ciclo, estimuladas pelo calor, que são repetidas por várias vezes, em ciclos: abertura da fita de DNA que servirá de molde, por desnaturação térmica (etapa com duração entre 30s e 1min a temperatura de 92-96°C; pareamento de oligonucleotídeos sintéticos, que funcionam como os iniciadores da reação de polimerização, a cada uma das fitas do DNA molde, à região complementar da fita que sofrerá a duplicação duração de 30s a 1min a temperatura entre 58 e 65°C; polimerização, através de uma enzima polimerase, das novas fitas de DNA a partir de cada um dos iniciadores, utilizando cada um dos quatro dNTP como substrato da reação de polimerização (duração entre 45s e 1min, a 72°C (COSTA, 2010).

Nos últimos anos, as técnicas moleculares têm sido utilizadas com frequência na identificação e caracterização de bactérias. Dentre as técnicas utilizadas, a reação em cadeia da polimerase (PCR) vem se destacando na área da microbiologia para detecção de micro-organismos em amostras de leite e outros alimentos (AHMADI et al., 2010).

A maior vantagem desse método é possuir alta sensibilidade e precisão, mesmo quando são testadas amostras com baixa concentração de micro-organismos (SANTILIANO et al., 2011).



As técnicas de análise moleculares permitem a identificação de cepas com potencial para produção de determinadas toxinas, já que nem sempre são expressas, permitindo a detecção de genes de fatores de virulência de maneira rápida e confiável, com alta sensibilidade e especificidade (SANTANA et al., 2010; VASCONCELOS et al., 2011).

## REFERÊNCIAS

- AHMADI, M.; ROHANI, S.M.R.; AYREMLOU, N. Detection of *Staphylococcus aureus* in milk by PCR. **Com. Clin. Pathol.**, v. 19, n. 1, p. 91-94, 2010.
- ANDRADE, M. A. **Tipagem molecular e investigação dos genes toxigênicos em *Staphylococcus aureus* isolados de amostras clínicas.** 2008. 126f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife2008.
- ANDRADE, U. V. C.; HARTMANN, W.; MASSON, M. L. Isolamento microbiológico, contagem de células somáticas e contagem bacteriana total em amostras de leite. **ARS Veterinária.** v. 25; n. 3; p. 129- 135, 2009.
- ARCURI, E. F. et al. Contagem, isolamento e caracterização de bactérias psicrotóxicas contaminantes de leite cru refrigerado. **Ciência Rural, Santa Maria,** v. 38, n. 8, p. 2250-2255, 2008.
- AL-TARAZI, Y.; ALBETAR, M.; ALABOUDI, A. Biotyping and enterotoxigenicity of Staphylococci isolated from fresh and frozen meat marketed in Jordan. **Food Research International.**v. 42, p. 374-379, 2009.
- ARGUDIM, M.A., MENDOZA, M.C., RODICIO, M.R. Food Poisoning and *Staphylococcus aureus* Enterotoxins. **Toxin** n.2, p 1751-1773, 2010.
- BARBOSA, T. C. R. **Surtos de algumas doenças transmitidas por alimentos no Brasil.** [online]. 2009. 28 f. Monografia (Pós Graduação em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, 2009.
- BASTOS, C. P. **Deteção, prevalência e expressão de genes de enterotoxinas clássicas de *Staphylococcus aureus* isolados de alimentos e surtos** - Pelotas, 2013.-91f. : il.- Tese (Doutorado ) –Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2013.

BELOTI, V. et al. Qualidade microbiológica e físico-química do leite cru refrigerado produzido no município de Sapopema - PR. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 16, p. 16, 2011.

BANDOCH, P.; MELO. Prevalência de mastite bovina por *Staphylococcus aureus*: uma revisão bibliográfica. Publicatio UEPG: Ciências Biológicas e da Saúde. Ponta Grossa, v17, n.1, p.47-51, 2011. Disponível em: <<http://www.revistas2.uepg.br/index.php/biologica/article/view/2592/2455>>. Acesso em: 28 agosto 2014.

BANDEIRA, F.S. et al. Frequency of *Staphylococcus aureus* from bovine subclinical mastitis cases, in southern Rio Grande do Sul, Brazil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.80, n.1, p.1-6, 2013.

BORGES, M. F. et al. *Staphylococcus* enterotoxigênicos em leite e produtos lácteos, suas enterotoxinas e genes associados: revisão. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 26, n. 1, p. 70-86, 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Métodos de análises microbiológicas para alimentos. Brasília-DF: Ministério da Agricultura Pecuária e Desenvolvimento**; 2000. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/servlet/VisualizarAnexo?id=6078>>. Acesso em: 25 de agosto 2014.

BRASIL, Ministério de Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Instrução Normativa nº 62 de 29/12/2011**. Instrução Normativa n.62, de 29 de dezembro de 2011. Diário Oficial da União, Brasília, Distrito Federal, 30 de dezembro de 2011. Seção 1.

Brasil (2013). Ministério da Saúde. Situação Epidemiológica, dados Epidemiológicos, DTA período de 2000 a 2011. Disponível em: <[http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id\\_area=1550](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1550)>. Acesso em: 30/08/2014.

BRITO, M. A. V. P. **Identificando fontes e causas de alta contagem bacteriana total do leite do tanque. Panorama do Leite on line, n. 40, 2010.** Disponível em: <[http://inovadefesa.ning.com/group/defesasanitrianacadeiadoleite/forum/topics/identificando-fontes-e-causas?xg\\_source=activity](http://inovadefesa.ning.com/group/defesasanitrianacadeiadoleite/forum/topics/identificando-fontes-e-causas?xg_source=activity)>. Acessado em: 31 de Junho de 2014.

CAPURRO, A. et al. Identification of potential sources os *Staphylococcus aureus* in herds with mastitis problems. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 1, p. 180-191, 2010.

CITADIN, A.S. et al. Microbiological quality of raw Milk and factores that inflence its quality. **Rev. Bras. Saúde Prod. An.**, v.10, n.1, p.52-59, jan/mar, 2009.

CORREA, C. P.A; RIBAS M. M. F.; MADRONA G. S. Avaliação das condições higiênico sanitárias do leite cru em pequenas propriedades do município de Bom Sucesso- PR. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**. v. 03, n 02, p. 21-28, 2009.

COSTA, R. J. Técnica de Biologia Molecular: **PCR (Reação em Cadeia da Polimerase)**. Disponível em <http://www.portaleducacao.com.br/farmacia/artigos/8577/tecnica-de-biologia-molecularpcr-reacao-em-cadeia-da-polimerase>. Acessado em: 28 de agosto de 2014.

COSTA, P.D.; DIAS, R.S. Ocorrência de linhagens enterotoxigênicas de *Staphylococcus* spp. em leite e derivados envolvidos em Doenças Transmitidas por Alimentos. **Periódico Científico do núcleo de Biociências**, Centro Universitário Metodista Izabela Hendrix. Belo Horizonte, MG, v.03, n.05, 2013.

DANTAS, J. S. **Palestra proferida na abertura do Congresso Internacional do Leite, 10. 2011, Maceió: Centro de Convenções, 26 out. 2011.**

DIEDRICH, C. et al. Detecção de *Staphylococcus aureus* através da técnica de reação em cadeia da polimerase (pcr), em amostras de leite bovino in natura obtidas de produtores no sul do Brasil. **Alim. Nutr. = Braz. J. Food Nutr.**, Araraquara, v.24, n.3, p. 291-296, 2013.

DIEDRICH, C. et al. Detecção de *Staphylococcus aureus* em amostras de leite cru. **Alim. Nutr. = Braz. J. Food Nutr.**, Araraquara, v.24, n.3, p. 291-296, jul./set. 2013.

DORES, M. T. **Detecção de genes de enterotoxinas de *Staphylococcus coagulase positiva* isolados do queijo canastra, minas gerais.** x, 66f.:Il.; 29cm. Tese (Doutorado) – Departamento de Tecnologia de Alimentos Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, MG, 2013.

EFSA (European Food Safety Authority). (ECDC) (European Centre for Disease Prevention and Control). (2011). The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2009; **EFSA Journal**. Disponível em: <[www.efsa.europa.eu/efsajournal](http://www.efsa.europa.eu/efsajournal)>. Acesso em: 20 de setembro de 2014.

EUZÉBY, J. P. **List of Bacterial names with Standing in Nomenclature**. Disponível em: <<http://www.bacterio.cict.fr/s/staphylococcus.html>>. Acesso em: 23 de agosto. 2014.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Food and Agricultural commodities production**. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>>. Acessado em: 30 julho de 2014.

FDA (Food and Drug Administration). Bad bug book. Handbook of Foodborne pathogenic microorganisms and natural toxins. **Food and Drug Administration**, 2nd ed. (2012). Disponível em: <<http://www.fda.gov/downloads/Food/FoodSafety/FoodborneIllness/FoodborneIllnessFoodbornePathogensNaturalToxins/BadBugBook/UCM297627.pdf>>. Acessado em: 30 julho de 2014.

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

FERREIRA, R. M. et al. Pesquisa de *Staphylococcus coagulase positiva* em queijo tipo Minas frescal artesanal. **PUBVET Londrina**, 5, 152ed, artigo 1021, 2011.

FIGUEIREDO, S. P. et al. *Staphylococcus spp.* no leite cru e no queijo produzido no Serro, Minas Gerais. XXIV CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOTECNIA, 2014 Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória ES, **Anais...** ISSN 2358-2030, 2014.

FONTANA, V.L.D.S. et al. Caracterização molecular de estafilococos isolados de vacas com mastite subclínica e ordenhadores. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.79, n.4, p.469-476, out./dez., 2012.

FUSCO, V. et al. International Journal of Food Microbiology Rapid and reliable identification of *Staphylococcus aureus* harbouring the enterotoxin gene cluster ( *egc* ) and quantitative detection in raw milk by real time PCR. **International Journal of Food Microbiology.** v. 144, n. 3, p. 528 – 537, 2011.

GHARIB, A.A.; ADEL ATTIA, M.A.; BENDARY, M.M. Detection of the Coa Gene in *Staphylococcus aureus* from Different Sources by Polymerase Chain Reaction. **Intl. J. Microbiol. Res**, v. 4, n1, p. 37- 42, 2013.

GENEROSO D, LANGONI H. Avaliação da presença de Salmonella sp. na criação de bovinos de leite. **Vet. e Zootec.** v. 18, n. 4, p. 661-667 2011.

GUIDO, E. S. et al. Uma abordagem da extensão universitária na melhoria da qualidade do leite na cadeia produtiva do município de Barbosa Ferraz (Paraná). **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos.** v. 28; n.2; p. 303-312, 2010.

HENNEKINNE, J-A., DE BUYSER, M-L., DRAGACCI, S. *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. **FEMS Microbiol Rev**, 36, 815-636. (2012).

JOHLER, S.; STEPHAN, R. Staphylococcal food poisoning: a current review. **Archiv für Lebensmittelhygiene.** v. 61, p. 220-228, 2010.

KEEFE, G. Update on control of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* for management of mastitis. **Journal of Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 28, n.2, p. 203-216, 2012.

LAMAITA, H. C. et al. Contagens de *Staphylococcus* sp. e detecção de enterotoxinas estafilocócicas e toxina da síndrome do choque tóxico em amostras de leite cru refrigerado. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 57; n.5; p.702-709, 2005.

MACIEL, J.F. et al. Qualidade microbiológica de leite em comercializado em Itapetininga-BA. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.9, n.3, p. 443-448, 2008.

MARTINS, R. P. et al. Prevalência e etiologia infecciosa da mastite bovina na microrregião de Cuiabá, MT. **Ciência Animal**. v.11; n.1; p. 181- 187, 2010.

MARTINS, P.F., ANDRADE, H.V., Identificação de Resíduos de Antibióticos na Recepção de Leite Cru Pré-Beneficiado Como Implantação do Plano APPCC em Laticínios. **FAZU em Revista**, v.8, p.108-114. 2011.

MICHEL, A.; SYRING, C.; STEINER, A.; GRABER, H. U. Intramammary infections with the contagious *Staphylococcus aureus* genotype B in Swiss dairy cows are associated with low prevalence of coagulase-negative staphylococci and *Streptococcus* spp. **The Veterinary Journal**, v. 188, n. 3, p. 313-317, 2011.

MOLINERI, A. I. et al. Association between milking practices and psychrotrophic bacterial counts in bulk tank milk. **Revista Argentina de Microbiologia**, v. 44, p. 187-194, 2012.

MONTANHINI, M. T. M. HEIN, K. K. Qualidade do leite cru comercializado informalmente no município de Pirai do Sul, Estado do Paraná, Brasil. **Rev. Inst. Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 68, n. 393, p. 10-14, jul/ago., 2013.

MUSTAFA, M.M.S.; JAIN, L.C.S.; AGRAWAL, C.V.K. Food Poisoning Outbreak in a Military Establishment. **MJAFI**, v. 65, n. 3, p. 240-243, 2009.

NERO, L.A., MATTOS, M.R., ORTOLANI, M.B.T. *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. in raw milk produced in Brazil: occurrence and interference of indigenous microbiota in their isolation and development. **Zoonoses Public Health**, v. 55, p. 299–305, 2008.

NERO, L. A. ; VIÇOSA, G. N.; PEREIRA, F. E. V. Qualidade microbiológica do leite determinada por características de produção. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 2, p. 386-390, 2009.

NÖRNBERG, M. F. B. L.; TONDO, E. C.; BRANDELLI, A. Bactérias psicrotólicas e atividade proteolítica no leite cru refrigerado. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 37, n. 2, p. 157-163, 2009.

OBESO, J. M. et al. Use of Logistic Regression for Prediction of the Fate of *Staphylococcus aureus* in Pasteurized Milk in the Presence of Two Lytic Phages. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n.18, p. 6038-6046, 2010.

OLIVEIRA, C. M. C. et al. Prevalência e etiologia da mastite bovina na bacia leiteira de Rondon do Pará, estado do Pará. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, p. 104-110, 2011.

ORTOLANI, M.B.T. et al. Microbiological quality and safety of raw milk and soft cheese and detection of autochthonous lactic acid bacteria with antagonistic activity against *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., and *Staphylococcus aureus*. **Foodborne Pathogens and Diseases**, v. 7, p. 175-180, 2010.

PACHECO, W.F. et al. A cadeia produtiva do leite: um estudo sobre a organização da cadeia e análise de rentabilidade de uma fazenda com opção de comercialização de queijo ou leite. **Revista Razão Contábil e Finanças, Fortaleza**, v.3, n. 1, Jan./Jun. 2012.

PINTO P, A. A. et al. PERFIL Microbiológico do leite bovino produzido na bacia leiteira de alagoas quanto à presença de *Staphylococcus coagulase* positivo. **Revista Semente**, v. 6, n. 6, p. 191-197, 2011.



PINCHUK, I.V.; BESWICK, E.J.; REYES, V.E. Staphylococcal Enterotoxins. **Toxins**, v. 2, n. 8, p. 2177-2197, 2010.

REZER, A. P. S. **Avaliação da Qualidade Microbiológica e Físico-Química do leite UHT integral comercializado no Rio Grande do Sul**. 2010, 73 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2010.

RIEKERINK, R. G. M. O. et al. Management practices associated with the bulk-milk prevalence of *Staphylococcus aureus* in Canadian dairy farms. **Preventive Veterinary Medicine**. v. 97; p.20-28, 2010.

RIBEIRO, M.G. et al. Microrganismos patogênicos, celularidade e resíduos de antimicrobianos no leite bovino produzido no sistema orgânico. **Pesq. Vet. Bras.**, v.29, n.1, p.52-58, 2009.

Rosengren, A., Fabricius, A., Guss, B., Sylven, S., Lindqvist, R. Occurrence of foodborne pathogens and characterization of *Staphylococcus aureus* in cheese produced on farm-dairies. **Int J Food Microb**, n. 144, p. 263–269, 2010.

RUWER, C.M.; MOURA, J.F.; GONÇALVES, M.J.F. Surtos de doenças transmitidas por alimentos em Manaus, Amazonas (2005-2009): o problema do queijo coalho. **Segurança alimentar e nutricional, Campinas** [online], v. 18, n. 2, p. 60-66, 2011.

SANTILIANO, F.C. et al. Análise comparativa dos métodos de detecção de enterotoxinas estafilocócicas de importância médica e veterinária. **Pubvet**, Londrina, v. 5, n. 3, p. 1327-1342, 2011.

SANTANA, E. H. W. et al. Assesment of the risk of raw milk consumption related to *staphylococcal* food poisoning. **Cien. Anim. Bras.**, Goiânia, v. 11, n. 3, p.643-652, jul./set., 2010.

SANTANA, E.H.W. et al. Estafilococos em Alimentos. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.77, n.3, p.545-554, 2010.

SALVADOR, F. C. et al. Mastite: Controle e Profilaxia no Rebanho Bovino. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**. v. 08, n. 15; p.1-13, 2010.

SANTOS, L.L.; PEDROSO, T.F.F.; GUIRRO, E. Perfil etiológico da mastite bovina na bacia de Santa Isabel do Oeste, Paraná. **Ciência Animal Brasileira**, v.11, n.4, p.860-866, 2010.

SENGER, A. E. V.; BIZANI, D. Pesquisa de *Staphylococcus aureus* em queijo minas frescal, produzido de forma artesanal e industrial, comercializado na cidade de Canoas/RS, Brasil. **Revista de Ciências Ambientais**, Canoas, v.5, n.2, p. 25 a 42, 2011 / ISSN 1981-8858.

SILVA, G. V. **Avaliação das Espécies e Perfil de Suscetibilidade aos Antimicrobianos de *Staphylococcus* Isolados de Leite de Ovelha**. 2012. 77p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Ciência de Alimentos). Instituto de Tecnologia, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2012.

SOUZA, D. P. Avaliação da qualidade higiênico-sanitária do leite utilizado no restaurante escola da Universidade Federal de Pelotas. **Publicação científica do Hospital das Clínicas de Porto Alegre e Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul**.v.30; n.01; p.27-30, 2010.

SCHEDLER, C. A. et al. Microbiological quality of raw milk and factors that influence its quality. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador, v. 10, n. 1, p. 52-59, 2009.

SPANU, V. et al. Virulence factors and genetic variability of *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw sheep's cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v. 153, n. 1-2, p. 53-57, 2012.

TEIXEIRA, L. M. et al. *Staphylococcus aureus*. **Microbiologia**. 5.ed. Ed. Atheneu, 2008. Cap. 20, p. 175-182.

THAKUR, M.; OLAFSSON, S.; LEE, J.S.; HURBURG, C.R. Data mining for recognizing patterns in foodborne disease outbreaks. **Journal of Food Engineering**, v. 97, p. 213-227, 2010.

VASCONCELOS, N.G. et al. Molecular detection of enterotoxins E, G, H and I in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci isolated from clinical samples of newborns in Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, v. 111, n. 3, p. 749-762, 2011.

VIÇOSA, G.N. et al. Enumeration of coagulase and thermonuclease-positive *Staphylococcus* spp. in raw milk and fresh soft cheese: An evaluation of baird-parker agar, rabbit plasma fibrinogen agar and the petrifilm\_ staph express count system. **Food Microbiology**, n. 27, p. 447-452, 2010.

VILLA, F. B. **Qualidade físico-química, microbiológica e resíduos de antimicrobianos em leite in natura comercializado informalmente em Brotas, SP**. 50f. 2007. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual Paulista. Botucatu, 2007.

WINCK, C. A. et al. Padrões de qualidade do leite cru no Brasil: Inserção mercadológica internacional ou exclusão social. In: VIII CONGRESSO LATINOAMERICANO DE SOCIOLOGIA RURAL, 2010, Porto de Galinhas, **Anais**. Porto de Galinhas: p. 1-18, 2010.

WALLIN-CARLQUIST, N. et al. Prolonged expression and production of *Staphylococcus aureus* enterotoxin A in processed pork meat. **International Journal of Food Microbiology**. v. 141, p. 69-74, 2010.

ZUCALI, M. et al. Effects of season, milking routine and cow cleanliness on bacterial and somatic cell counts of bulk tank milk. **Journal of Dairy Research**, v. 78, p. 436-441, 2011.

## **5 ARTIGO: DETECÇÃO DE GENES QUE CODIFICAM PARA ENTEROTOXINAS PRODUZIDAS POR *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ISOLADOS DE LEITE DE TANQUES EXPANSÃO COMUNITÁRIOS EM ALAGOAS**

**RESUMO** - Objetivou-se com esse estudo detectar genes que codificam para enterotoxinas produzidas por *Staphylococcus aureus* isolados de leite cru proveniente de tanques de expansão comunitários no Estado de Alagoas. As estirpes foram cedidas pelo laboratório de Inspeção de Leite e Derivados da Universidade Federal de Alagoas. As 39 amostras foram anteriormente submetidas a provas bioquímicas dentre elas o teste da coagulase e posteriormente identificadas e armazenadas à -20°C. Foram reativadas e submetidas à reação em cadeia polimerase (PCR) utilizando primers específicos. Dentre as 39 estirpes de *Staphylococcus* coagulase positiva submetidas à pesquisa do gene Nuc, 69,2% (27/39) foram identificados como *Staphylococcus aureus* pela técnica da (PCR). Das 27 amostras de *Staphylococcus aureus* submetidos à pesquisa de enterotoxinas clássicas Seb, Sec e See e as novas toxinas Seh e Sei, 18,51% (5/27) foram positivas para gene de enterotoxinas, sendo que os fragmentos de genes envolvidos na síntese de enterotoxinas clássicas Seb, Sec e See e as novas toxinas Sei, não foram amplificados em nenhum dos isolados, apenas fragmentos de gene envolvido na síntese Seh foi amplificado. Os fragmentos dos genes envolvidos na síntese de  $\alpha$ -hemolisina amplificaram 81,5% (22/27). E para  $\beta$ -hemolisina amplificaram 51,8% (14/27). Conclui-se com esse estudo, que o alto percentual de *Staphylococcus aureus* com a presença de genes capaz de produzir enterotoxinas estafilocócicas encontradas no leite cru, é um indicativo de riscos para saúde pública, devido o seu potencial para a produção de enterotoxinas termoestáveis que não são eliminadas durante os processos térmicos da indústria, podendo causar intoxicação alimentar. *Staphylococcus aureus* com a presença do gene capaz de produzir as enterotoxinas estafilocócicas no leite cru indica uma alta probabilidade de produção da mesma.

**Palavras-chaves:** Saúde pública, PCR, Toxinas, Termoestabilidade

## **DETECTION OF GENES ENTEROTOXIGENIC *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* MILK TANKS COMMUNITY ALAGOAS**

**ABSTRACT** - The objective of this study was to detect genes encoding for enterotoxins produced by *Staphylococcus aureus* isolates from raw milk from expansion of community in the State of Alagoas tanks. The strains were provided by the laboratory of Milk and Dairy Products Inspection, Federal University of Alagoas. The 39 samples were previously subjected to biochemical tests among them the coagulase test and subsequently identified and stored at -20°C. Were reactivated and subjected to polymerase chain reaction (PCR) using specific primers. Among the 39 strains of coagulase positive *Staphylococcus* undergoing research Nuc gene, 69.2% (27/39) were identified as *Staphylococcus aureus* by PCR technique. Of the 27 samples of *Staphylococcus aureus* enterotoxin underwent investigation of classical (Seb), (Sec) and (See) and new toxins (Seh) and (Sei), 18.51% (5/27) were positive for enterotoxin gene, and fragments of genes involved in the synthesis classical enterotoxins Seb, Sec and See and the new toxins Sei were not amplified in any of the isolates, only fragments of the gene involved in the synthesis Seh was amplified. Fragments of the genes involved in the synthesis of  $\alpha$ -hemolysin amplify 81.5% (22/27). And for  $\beta$ -hemolysin amplified 51.8% (14/27). This study concluded that the high percentage of *Staphylococcus aureus* with the presence of gene capable to produce staphylococcal enterotoxins found in raw Milk is a indicative of risks to public health due to their potential to produce thermostable enterotoxin that are not eliminated during the industrial thermal process and could food poisoning. *Staphylococcus aureus* with the presence of gene capable of producing staphylococcal enterotoxins in raw milk, indicating a high probability of producing the same.

**Keywords:** Public health, PCR, Toxin, Thermostability

## 5.1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o quarto maior produtor mundial de leite, com uma produção de 32,304.421 toneladas, representando 8,7% da produção mundial, ficando atrás dos Estados Unidos, Índia e China (FAO, 2013). O Estado de Alagoas é o sexto produtor da região Nordeste ficando abaixo da Bahia, que tem o maior rebanho com 10,2 milhões de cabeça, de Pernambuco, do Ceará, do Maranhão e de Sergipe (BRASIL, 2011).

No entanto as características de produção de leite no país dificultam o desenvolvimento da atividade, pois, por serem pequenos produtores, geralmente investem pouco na atividade, possuem baixo conhecimento técnico, com falta de controle sanitário dos animais e pouca higiene durante a ordenha, conservação e transporte, podendo resultar em baixa qualidade da matéria-prima. (NERO et al., 2009),

A principal norma referente à legislação sanitária federal sobre a produção de leite é a Instrução Normativa n° 62 (IN62), do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, publicada em novembro de 2011 que tem como objetivo melhorar a qualidade do leite oferecido aos consumidores no Brasil e no exterior (BRASIL, 2011).

A contaminação do leite por patógenos é realidade no Brasil e tem importância na produção animal e na saúde pública (DIEDRICH, et al., 2013). *Staphylococcus aureus* é um dos agentes etiológicos mais comuns de doenças bacterianas em todo o mundo devido à sua capacidade de produzir uma ampla gama de exotoxinas e outros fatores de virulência (FUSCO et al., 2011).

Enterotoxinas estafilocócicas são proteínas extracelulares de baixo peso molecular, hidrossolúveis e resistentes à ação de enzimas proteolíticas do sistema digestivo, permanecendo ativas após a ingestão. Outra característica importante é sua termoestabilidade, sendo capaz de resistir a tratamentos térmicos, como a pasteurização e a ultrapasteurização (SENGER E BIZANI, 2011). Além de possuírem habilidade para provocar êmese e gastroenterite (PINCHUK et al., 2010).

O potencial de virulência dos diferentes isolados de *Staphylococcus aureus* é determinado pela presença ou ausência de genes de fatores de virulência, como genes que codificam enterotoxinas estafilocócicas, leucocidinas, exfoliatinas,  $\alpha$ -hemolisina,  $\beta$ -hemolisinas e outras exotoxinas (SPANU et al., 2012).

A contaminação do leite *in natura* por bactérias *Staphylococcus* spp. principalmente as do gênero *Staphylococcus aureus* é uma preocupação de saúde pública devido a sua capacidade em produzir enterotoxinas termoestáveis responsáveis por surtos de intoxicação alimentar. Objetivou-se com esse estudo detectar genes que codificam para enterotoxinas produzidas por *Staphylococcus aureus* isolados de leite cru proveniente de tanques de expansão comunitários no Estado de Alagoas.

## 5.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.2.1 Origem dos isolados

Foram utilizadas 39 amostras de *Staphylococcus* coagulase positiva. As amostras foram gentilmente cedidas pelo Banco de Culturas do Laboratório de Inspeção de Leite e Derivados da Universidade Federal de Alagoas, Viçosa-AL.

Os isolados bacterianos foram provenientes de 160 amostras de leite cru, proveniente de tanques de expansão pertencentes a uma cooperativa de produtores de leite do estado de Alagoas, no período de Janeiro a agosto de 2013, em 23 municípios pertencentes as três mesorregiões do estado (Agreste Alagoano, Leste Alagoano e Sertão Alagoano) (figura 2).



Figura 2 - Divisão do estado em Mesorregiões com os municípios que participaram do estudo.

No Laboratório de Doenças Infecciosas da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) Recife-PE, foi realizada a reativação das culturas e posterior confirmação do grau de pureza das características macro e microscópicas das mesmas para extração do DNA e amplificação dos genes através da PCR.

### **5.2.2 Reativação das culturas bacterianas do estoque**

Para reativação dos isolados, uma pequena alíquota de cada amostra foi plaqueada pela técnica de semeadura em estrias por esgotamento em Agar Sangue de ovino a 5% e incubados a 37°C por 24 horas. As colônias características foram submetidas à coloração de Gram. Após leitura das lâminas, as colônias isoladas foram repicadas individualmente com alça de platina e transferida para caldo BHI, incubados a 37°C por 24 horas. Após período de incubação foram feitas as leituras dos tubos, verificando-se a turvidez característica com o objetivo de confirmar a pureza das culturas a ser utilizadas nas análises subseqüentes, seguindo recomendações de (SAEI et al., 2009).

### **5.2.3 Extração do (DNA) molecular**

Após a recuperação dos isolados e confirmação do grau de pureza, foi realizada a extração do DNA a partir de culturas bacterianas em caldo BHI. Para a extração do DNA das amostras foi utilizado o kit comercial Wizard® Genomic DNA Purification (Promega), seguindo as recomendações do fabricante.

### **5.2.4 Amplificação**

Após a extração do DNA foram amplificados oito fragmentos de genes (Nuc, Seb, Sec, Seg, Seh, Sei, hla e hlb) mediante reações em cadeia da polimerase (PCR) utilizando oligonucleotídeos específicos (Tabela 1).



**Tabela 1 - Oligonucleotídeos utilizados na amplificação dos genes.**

<i>Locus</i>	Nome	Oligonucleotídeo (5' - 3')	Fragmento amplificado	Ta (°C) <sup>1</sup>
Nuc	Nuc_F	GGTTCTGAAGATCCAACAGTAT	296 pb	61
	Nuc_R	GCTAAGCCACGTCCATATTTA		
Seb	Seb_F	CCCGTTTCATAAGGCGAGTT	314 pb	57
	Seb_R	ACGTAGATGTGTTTGGAGCTAAT		
Sec	Sec_F	AAAGGCAAGCACCGAAGTA	340 pb	60
	Sec_R	AGTGTAACAGCTCAAGAACTAGAC		
Seg	Seg_F	GCCAGTGTCTTGCTTTGTAATC	491 pb	56
	Seg_R	GAATGCTCAACCCGATCCTAA		
Seh	Seh_F	CACATCATATGCGAAAGCAGAAG	365 pb	60
	Seh_R	CCCAAACATTAGCACCAATCAC		
Sei	Sei_F	AGGCAGTCCATCTCCTGTATAA	568 pb	55
	Sei_R	TGCTCAAGGTGATATTGGTGTAG		
Hla	hla_F	CTGTAGCGAAGTCTGGTGAAA	293 pb	62
	hla_R	CGGCCTTATTGGTGCAAATG		
Hlb	hla_F	GCCAAAGCCGAATCTAAGAAAG	495 pb	60
	hla_R	ATCATGTCCAGCACCACAA		

<sup>1</sup> Temperatura de alinhamento

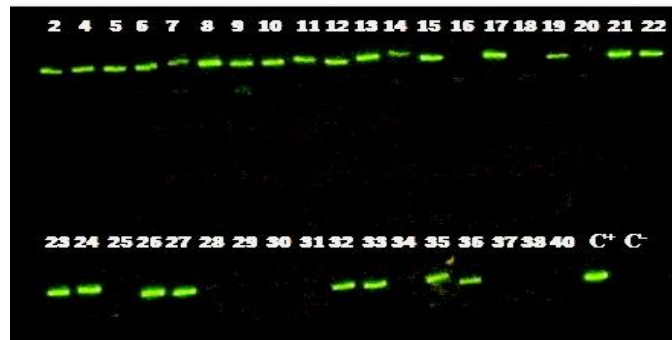
A reação de PCR foi realizada num volume total de 25 µL, contendo na mistura PCR buffer (10 mM Tris-HCl, pH 9.0; 50 mM KCl e 0.1 % Triton X-100), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 250 µM de cada nucleotídeo, 0,5 µM de cada um dos iniciadores específicos para cada reação, 1,5U de Taq DNA Polimerase (PROMEGA), 20 ng de DNA e completou-se o volume final com água destilada.

As condições de amplificação consistiram em: 5 min a 94°C na etapa de desnaturação, 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min com a temperatura de alinhamento (Tabela 1), 1 min a 72°C, e uma extensão final a 72°C durante 5 min.

Para a visualização dos produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2%, tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE) (1X) com corante Blue Green Loading Dye I (LGC Biotecnologia) usando 0,3 µL por cada 10 µL de produto amplificado e visualizados sob iluminação ultravioleta (UV).

### 5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 39 amostras de *Staphylococcus* coagulase positiva submetidos à pesquisa do gene Nuc, 69,2% (27/39) foram caracterizadas como *Staphylococcus aureus* pela técnica da PCR. O teste da coagulase é um dos testes bioquímicos mais utilizados para identificação da espécie, a habilidade em coagular o plasma é um indicativo de presença da espécie *Staphylococcus aureus*, porém a sensibilidade da técnica da PCR revelou ausência de fragmentos de amplificação em 30,8% (12/39) das estirpes investigadas, indicando que essas cepas são pertencentes a outras espécies de *Staphylococcus* coagulase positiva como, *S. hyicus* e *S. intermedius* (Figura 3).



**Figura 3 - Eletroforese em gel agarose a 2% dos produtos de amplificados por PCR, para detecção do gene Nuc em isolados de *Staphylococcus* coagulase positiva. C+ = Controle positivo C- = controle negativo.**

*Staphylococcus aureus* tem uma participação significativa nos casos de intoxicação alimentar devido sua capacidade em produzir enterotoxinas, e sua alta incidência no leite pode ser um indicativo de falhas na higiene durante a obtenção do leite. Tendo em vista que os principais reservatórios são as mãos dos ordenhadores e glândula mamária de vacas com mastite (FONTANA et al., 2012).

Borges et al. (2008) encontraram resultados semelhantes aos observados nesse estudo, quando observaram alta frequência de espécies coagulase positiva, com prevalência de *Staphylococcus aureus* em 67% (16/24) dos isolados leite cru.

A espécie *Staphylococcus aureus*, também foi a principal, dentre o grupo de *Staphylococcus* coagulase positiva identificada por Santos et al. (2010), em 14,99% (64/427) dos isolamentos, em vacas leiteiras do Oeste do Paraná.

Em uma investigação epidemiológica de DTAs feita por Nascimento em (2013), no município de Porto Alegre no período entre 2003 e 2011, 163 surtos de intoxicação alimentar foram investigados. Destes, 14% foram provocados por *Staphylococcus aureus*. Através de análises moleculares foi possível identificar entre as 144 cepas isoladas, 101 cepas (70,14%) pertencentes à espécie *staphylococcus aureus* (SILVA 2013).

As 27 amostras caracterizadas como *Staphylococcus aureus* que foram submetidos a pesquisas dos genes que codificam as enterotoxinas Seb, Sec, See e Sei não amplificaram em nenhum dos isolados (Tabela 2). Nesse estudo apenas fragmentos de genes envolvidos na síntese de Seh foram amplificados 18,51% (5/27) amostras.

As amostras de *Staphylococcus aureus* que codificam para o gene seh foram encontradas em tanques de duas das três mesorregiões pesquisadas, leste e agreste Alagoano.

*Staphylococcus aureus* portadores do gene seh que codificam para enterotoxina H é de grande importância em alimentos, pois a mesma possui potencial emético e está envolvida em diversos casos de intoxicação alimentar.

Segundo a Vigilância Epidemiológica da Secretaria de Estado da Saúde de Alagoas, não há notificação de casos de intoxicação alimentar causados por enterotoxinas estafilocócicas no banco de dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN). Por não fazer parte das doenças e agravos de notificação compulsória a intoxicação estafilocócicas não é notificada.

A intoxicação estafilocócica, na maioria dos casos, não é notificada aos órgãos de Vigilância Sanitária, o que leva à subnotificação da doença no Brasil e em outros países. Trata-se de doença de curso rápido (24-48 horas) e os indivíduos afetados, geralmente, não necessitam de atendimento médico (BORGES 2008).

**Tabela 2 - Detecção de genes (Seh) em estirpes de *Staphylococcus aureus* isolados de leite de tanques de expansão comunitários do Estado de Alagoas.**

Amostras															
Gene (Seh)															
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14		
-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-		
15	17	19	21	22	23	24	26	27	32	33	35	36		C <sup>+</sup>	C <sup>-</sup>
-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-		+	-

(+) = positivo para a presença de Seh e (-) Negativo para presença de Seh, C<sup>+</sup> = controle positivo, c<sup>-</sup> = controle negativo

Resultados semelhantes ao deste estudo foi encontrado por Rall et al. (2014) quando o gene *Seh* foi detectado em 8 (12,7%) uma única cepa foi isolada a partir de *Staphylococcus aureus* de animais saudáveis e sete estavam presentes em 62 vacas com mastite, onde a prevalência desse gene foi mais elevadas.

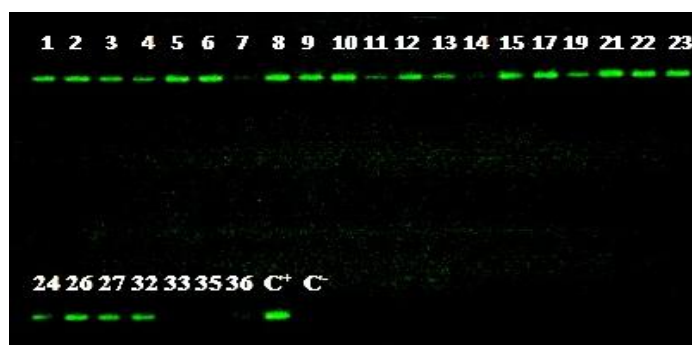
Silva (2013) em um estudo realizado em laticínios no Estado de São Paulo verificou que alguns fragmentos de genes envolvidos na síntese de Seb, Sed, See e Sej não foram amplificados em nenhum dos isolados corroborando com os dados encontrados nesse estudo. Na Noruega, Jorgensen et al. (2005) isolaram cepas portadoras do gene *Seh* envolvidas em surto de intoxicação estafilocócia causado por ingestão de purê de batata feito com leite cru.

Segundo Argudín et al. (2010), as enterotoxinas *Sea*, *Sec*, *Seg*, *Seh* possuem atividade emética, enquanto que a *Sei* apresenta fraca atividade emética e para a *Sej* essa atividade não foi identificada. Dessa forma a presença de genes *Seh* em *Staphylococcus* do leite cru apresenta um risco de intoxicação alimentar.

Borelli et al. (2011) avaliaram a presença dos genes toxigênicos *sea*, *seb*, *sec* e *sed* em 95 amostras de *Staphylococcus* spp. Isoladas de queijos provenientes de três fazendas diferentes da região da Serra da Canastra (MG), em diferentes períodos de maturação, e não encontraram resultado positivo em nenhuma delas.

Os fragmentos dos genes envolvidos na síntese de  $\alpha$ -hemolisina (*hla*) amplificaram 81,5% (22/27) e para  $\beta$ -hemolisina (*hlb*) amplificaram 70,3% (19/27) (Figuras 4 e 5).

YANG et al. (2012) verificando a presença de gene que codificam fatores de virulência, encontraram HLA (85%) e HLB (82%) respectivamente, em 39 amostras de *Staphylococcus aureus* isolados de leite de vaca com mastite.



**Figura 4 - Eletroforese em gel agarose a 2% dos produtos de amplificados por PCR, para detecção do gene *hla* em isolados de *staphylococcus aureus*. C+ = Controle positivo C- = controle negativo.**



**Figura 5 - Eletroforese em gel agarose a 2% dos produtos de amplificados por PCR, para detecção do gene *hlyB* em isolados de *Staphylococcus aureus*. C+ = Controle positivo C- = controle negativo.**

Abdou et al. (2012) analisaram amostras de queijos comercializados em Sharkia (Egito) e identificaram genes de *Staphylococcus aureus* conhecidos por fatores de virulência hemolisina, lecitinase e proteinases (caseína), as quais caracterizam a patogênese desse micro-organismo.

Morandi *et al.*, (2010) detectaram produção de hemólise em todos *Staphylococcus* isolados de leite, e observaram a produção de  $\alpha$ -hemolisina em 54% (66/122) das amostras,  $\beta$ -hemolisina em 40% (49/122) e  $\alpha/\beta$ -hemólise em 6% (7/122) dos isolados.

Esta exotoxina produzida por *Staphylococcus aureus* é responsável pela destruição de leucócitos e necrose tecidual (ARGUDIN et al., 2010; UNAL et al., 2012).

## 5.4 CONCLUSÃO

O alto percentual de *Staphylococcus aureus* com a presença de genes capaz de produzir enterotoxinas estafilocócicas encontradas no leite cru, é um indicativo de riscos para saúde pública, devido o seu potencial para a produção de enterotoxinas termoestáveis que não são eliminadas durante os processos térmicos da indústria, podendo causar intoxicação alimentar.

*Staphylococcus aureus* com a presença do gene capaz de produzir as enterotoxinas estafilocócicas no leite cru, indica uma alta probabilidade de produção da mesma.

Altas porcentagens de *Staphylococcus aureus* com genes que codificam fatores de virulência como  $\alpha$ -hemolisina (hla) e  $\beta$ -hemolisina (hly), aumentam a capacidade do micro-organismo se instalar no hospedeiro e conseqüentemente sua patogenicidade.

## REFERÊNCIAS

ARGUDIN, M.A.; MENDOZA, M.C.; RODICIO, M.R. Food Poisoning and *Staphylococcus aureus* Enterotoxins. **Toxins**, v. 2, n. 7, p. 1751-1773, 2010.

BASTOS, C. P. **Detecção, prevalência e expressão de genes de enterotoxinas clássicas de *Staphylococcus aureus* isolados de alimentos e surtos** - Pelotas, 2013.-91f. : il.- Tese (Doutorado ) –Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2013.

BIEN, J.; SOKOLOVA, O.; BOZKO, P. Role of uropathogenic *Escherichia coli* virulence factors in development of urinary tract infection and kidney damage. **International Journal of Nephrology**, 2012. doi: 10.1155/2012/681473, 2012.

BRASIL, Ministério de Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Instrução Normativa nº 62 de 29/12/2011**. Instrução Normativa n.62, de 29 de dezembro de 2011. Diário Oficial da União, Brasília, Distrito Federal, 30 de dezembro de 2011.

BRASIL (2013). **Ministério da Saúde. Situação Epidemiológica, dados Epidemiológicos**, DTA período de 2000 a 2011. Disponível em: <[http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id\\_area=1550](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1550)>. Acesso em: 30/08/2014.

BURNSIDE K., LMEBO A.REYES M. et al. Regulation of hemolysin expression and virulence of *Staphylococcus aureus* by a serine/threonine kinase and phosphatase. **Public Library of Science**, 5:1-16, 2010.

COELHO S.M.O. et al. Virulence factors and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Rio de Janeiro. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 29:369-374, 2009.

DIEDRICH, C. et al. Detecção de *Staphylococcus aureus* através da técnica de reação em cadeia da polimerase (pcr), em amostras de leite bovino in natura obtidas de produtores no sul do Brasil. **Alim. Nutr. = Braz. J. Food Nutr.**, Araraquara, v.24, n.3, p. 291-296, 2013.

EFSA (European Food Safety Authority). (ECDC) (European Centre for Disease Prevention and Control). (2011). The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2009; **EFSA Journal**. Disponível em: <[www.efsa.europa.eu/efsajournal](http://www.efsa.europa.eu/efsajournal)>. Acesso em: 20 de setembro de 2014.

FAO. **Food and Agriculture Organization of the United Nations. Food and Agricultural commodities production**. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>>. Acessado em: 30 de julho, 2014.

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

FUSCO, V. et al. Rapid and reliable identification of *Staphylococcus aureus* harbouring the enterotoxin gene cluster (egc) and quantitative detection in raw milk by real time PCR. **International Journal of Food Microbiology**. v. 144, n. 3, p. 528 – 537, 2011.

JORGENSEN, H. J. et al. An outbreak of staphylococcal food poisoning caused by enterotoxin H in mashed potato made with raw milk. **FEMS Microbiology Letters**, Malden, v. 252, p. 267–272, 2005b.

MORANDI, S.; BRASCA, M.; ANDRIGHETTO, C.; LOMBARDI, A.; LODI, R. Phenotypic and genotypic characterization of *Staphylococcus aureus* strains from Italian dairy products. **International of. Journal Microbiology**, v. 2009, p. 1-7, 2010.

MS (Ministério da Saúde). (2012b). Dados Epidemiológicos - DTA período de 2000 a 2011. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Vigilância epidemiológica das doenças transmitidas por alimentos do Ministério da Saúde**. Disponível em: <[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/dados\\_epidemiologicos.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/dados_epidemiologicos.pdf)>. Acessado em: 20 de setembro de 2014.



NERO, L. A.; VIÇOSA, G. N.; PEREIRA, F. E. V. Qualidade microbiológica do leite determinada por características de produção. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 2, p. 386-390, 2009.

OLIVEIRA, A.B.A.; DE PAULA, C.M.D.; CAPALONGA, R. Foodborne diseases, main etiologic agents and general aspects: a review. **Revista HCPA** 30, 279-285, 2010.

PINCHUK, I.V.; BESWICK, E.J.; REYES, V.E. Staphylococcal Enterotoxins. **Toxins**, v. 2, n. 8, p. 2177-2197, 2010.

RALL, V. L. M. et al. Diversity of *Staphylococcus* species and prevalence of enterotoxin genes isolated from milk of healthy cows and cows with subclinical mastitis. **Journal of Dairy Science** Vol. 97 No. 2, 2014.

ROSENGREN, A., et al. Occurrence of foodborne pathogens and characterization of *Staphylococcus aureus* in cheese produced on farm-dairies. **Int JFood Microb**, 144, 263–269, 2010.

SANTOS, L.L.; PEDROSO, T.F.F.; GUIRRO, E. Perfil etiológico da mastite bovina na bacia de Santa Isabel do Oeste, Paraná. **Ciência Animal Brasileira**, v.11, n.4, p.860-866, 2010.

SAEI HD, et al. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis based on polymorphism of the coagulase gene in the north west of Iran. **Vet Microbiol** 137(1–2):202–206. doi:10.1016/j.vetmic.2009.01.001, 2009.

SANTANA, E.H.W. et al. *Estafilococos* em alimentos. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 77, n. 3, p. 545- 554, jul./set. 2010.

SENGER, A. E. V.; BIZANI, D. Pesquisa de *Staphylococcus aureus* em queijo minas frescal, produzido de forma artesanal e industrial, comercializado na cidade de Canoas/RS, Brasil. **Revista de Ciências Ambientais**, Canoas, v.5, n.2, p. 25 a 42, 2011 / ISSN 1981-8858.

SOSPEDRA, I. et al. Survey of microbial quality of plant-based foods served in restaurants. **Food Control**, 30, 418-422, 2013.

SPANU, V. et al. Virulence factors and genetic variability of *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw sheep's cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v. 153, n. 1-2, p. 53-57, 2012.

ÜNAL, N. et al. Panton–Valentine leukocidin and some exotoxins of *Staphylococcus aureus* and antimicrobial susceptibility profiles of *staphylococci* isolated from milks of small ruminants. **Tropical Animal Health and Production**, v. 44, n. 3, p. 573-9, 2012.

YANG, F. L. et al. Detection of virulence-associated genes in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine clinical mastitis milk samples in Guangxi. **Tropical Animal Health and Production**, Edinburgh, v. 44, n. 8, p. 1821-1826, 2012.