



**Programa de Pós – Graduação *Stricto Sensu***  
**Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos**

Campus Rio de Janeiro

Paula Lisbôa Nascimento

**DETECÇÃO E PREVALÊNCIA DOS GENES *mecA* e *seh* DE *Staphylococcus sp.*  
ISOLADOS DE AMOSTRAS DE ALIMENTOS, SUPERFÍCIES E UTENSÍLIOS DE UMA  
COZINHA INDUSTRIAL DO RIO DE JANEIRO**

Rio de Janeiro – RJ

2016

Paula Lisbôa Nascimento

**DETECÇÃO E PREVALÊNCIA DOS GENES *mecA* e *seh* DE *Staphylococcus sp.*  
ISOLADOS DE AMOSTRAS DE ALIMENTOS, SUPERFÍCIES E UTENSÍLIOS DE UMA  
COZINHA INDUSTRIAL DO RIO DE JANEIRO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação *Stricto Sensu* em Ciência e Tecnologia de Alimentos do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro – IFRJ para obtenção do título de mestre.

Orientador: Prof. Dr<sup>o</sup>. Eliezer Menezes Pereira

Rio de Janeiro – RJ

2016

Ficha catalográfica elaborada por  
Cintia dos Santos Madureira  
CRB7 6613

N244 Nascimento, Paula Lisbôa.  
Detecção e prevalência dos genes *mecA* e *seh* de  
*staphylococcus* sp. isolados de amostras de alimentos,  
superfícies e utensílios de uma cozinha industrial do Rio de  
Janeiro / Paula Lisbôa Nascimento. – Rio de Janeiro, 2016.  
52 f.: 21 cm.

Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de  
Alimentos) – Instituto Federal de Educação, Ciência e  
Tecnologia do Rio de Janeiro, 2016.

Orientador: Prof. Dr. Eliezer Menezes Pereira

1. Alimentos – Contaminação 2. Microbiologia. I.  
Pereira, Eliezer Menezes. II. Título.

IFRJ/CMAR/CoBib

CDU 579.6

Paula Lisbôa Nascimento

**DETECÇÃO E PREVALÊNCIA DOS GENES *mecA* e *seh* DE *Staphylococcus sp.*  
ISOLADOS DE AMOSTRAS DE ALIMENTOS, SUPERFÍCIES E UTENSÍLIOS DE UMA  
COZINHA INDUSTRIAL DO RIO DE JANEIRO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós  
Graduação *Stricto Sensu* em Ciência e  
Tecnologia de Alimentos do Instituto Federal de  
Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de  
Janeiro – IFRJ para obtenção do título de  
mestre.

Data da aprovação: \_\_\_\_\_

---

Prof. Dr.º Eliezer Menezes Pereira

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro

---

Profª Drª Barbara Cristina Euzébio Pereira Dias de Oliveira

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro

---

Profª Drª Fernanda Sampaio Cavalcante

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro – RJ

2016

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus por guiar minhas escolhas e por me proporcionar força, persistência e foco nas atividades e por renovar as minhas energias a cada dia.

Ao meu Querido Marido que me incentivou a retornar aos estudos e que sempre me amparou com gestos amorosos e palavras de apoio nos momentos de dificuldades e que não permitiu que eu desistisse dessa etapa da minha vida.

Aos meus pais, que sempre estimularam os meus estudos e que batalharam e batalham até hoje para que eu possa me aperfeiçoar profissionalmente. À minha irmã que tem toda paciência do mundo quando eu preciso das explicações de informática e por ter ficado anos escutando eu estudar em voz bem alta.

Ao meu orientador, Prof.<sup>o</sup> Eliezer Pereira, que acreditou no meu projeto e me incentivou a querer fazer um bom trabalho e por ter sido totalmente paciente e ter sanado as minhas dúvidas em todos os momentos e que mesmo nos momentos difíceis e complicados da vida, consegui achar estímulo para não desistir e me fazer acreditar que nada é IMPOSSÍVEL quando temos ao nosso lado pessoas que nos transmitem amor e carinho. Com ele aprendi o verdadeiro significado da palavra SUPERAÇÃO.

Ao Juan que me ajudou durante a etapa de realização do PCR, que me auxiliou em todos os momentos necessários (foram muitos) e pelo seu excelente profissionalismo, companheirismo e atenção em me auxiliar na conclusão do meu mestrado. Você também foi um elo muito importante para a conclusão do trabalho.

NASCIMENTO, P.L. Detecção e prevalência dos genes *mecA* e *seh* de *Staphylococcus sp.* Isolados de amostras de alimentos, superfícies e utensílios de uma cozinha industrial do Rio de Janeiro. Dissertação apresentada ao Programa de Pós – Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ), Campus Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 2016.

## RESUMO

A contaminação microbiológica de alimentos tem sido alvo de constantes mudanças nos procedimentos de controle higiênico sanitário na produção de alimentos e as empresas necessitam de um controle de qualidade eficaz e eficiente em todo processo produtivo, sendo o binômio tempo/temperatura um dos controles, que deve ser o mais rigoroso possível para o acompanhamento deste tipo de serviço. Os *Staphylococcus* são micro-organismos cada vez mais associados a intoxicações alimentares, devida a produção de enterotoxinas. Estirpes multirresistentes, principalmente o MRS (*Staphylococcus spp.* Resistente a meticilina) tem cada vez mais sido isolados e descritos em infecções humanas, e são um problema grave de saúde pública. Este trabalho teve como objetivo determinar a prevalência e detectar fatores de virulência e resistência de *Staphylococcus spp.* isolados de amostras de alimentos produzidos em uma cozinha industrial de uma rede de supermercados do Rio de Janeiro, bem como dos respectivos utensílios e superfícies de manipulação utilizados no preparo dos mesmos, e analisar a presença de genes codificadores da enterotoxina estafilocócica H (*seh*) e de resistência a antimicrobianos (*mecA*). Foram coletadas 50 amostras entre janeiro e março de 2016. Após o isolamento dos micro-organismos, conforme preconizado na IN62, foram realizadas a caracterização das amostras através de identificação a nível espécie dos isolados por MALDI-TOF MS, a identificação dos genes *seh* e *mecA*, pelo método de reação em cadeia da polimerase (PCR). Das 50 amostras analisadas, 45 (90%) foram positivas para presença de *Staphylococcus sp.* Quatro amostras não pertenciam ao gênero *Staphylococcus*, sendo que das 41 amostras pertencentes ao gênero, 37 foram identificadas a nível de espécie, sendo que 40 amostras eram *Staphylococcus coagulase-negativo* (SCN), e apenas uma era coagulase-positiva (SCP), sendo identificada como *Staphylococcus aureus*. Das 40 amostras de SCN, 16 eram *S. saprophyticus* (40%), sendo a espécie mais encontrada dentre este grupo. A identificação das espécies pela técnica de MALDI-TOF MS demonstrou ser acurada, pois apenas 4 (9%) foram identificadas apenas a nível de gênero. 13 amostras foram positivas para o gene *mecA*, e foram consideradas resistentes pela técnica de *screening* em Agar com oxacilina. O gene *seh* fora detectado em uma amostra de isolada de fatiadora de frios. Conclui-se que os SCN encontram-se disseminados no ambiente, e podem carrear genes associados a resistência e precisam ter maior atenção no que diz respeito a sua detecção em alimentos.

**Palavras – chave:** *Staphylococcus*, Contaminação microbiológica, MALDI TOF MS, Resistência a meticilina, *mecA*, Enterotoxina H

NASCIMENTO, P.L. Detection and prevalence of *mecA* and *seh* genes and password *Staphylococcus* sp. Isolated from food samples, surfaces and utensils of an industrial kitchen of Rio de Janeiro. Dissertação apresentada ao Programa de Pós – Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ), Campus Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 2016.

## ABSTRACT

Food microbiological contamination has been the subject of constant changes in sanitary control procedures involving food production, and companies need an effective and efficient quality control throughout the production process, and the binomial time / temperature of these controls should be as thorough as possible to monitor this type of service. *Staphylococcus* are microorganisms which are increasingly associated with food poisoning, due to the enterotoxins production. Multiresistant strains, mainly MRS (Methicillin-resistant *Staphylococcus spp.*) has increasingly been isolated and described in human infections, being a serious public health problem. This study aimed to determine the prevalence and detection of virulence and resistance factors of *Staphylococcus spp.* Isolated from food samples produced in an industrial kitchen of a supermarket chain in Rio de Janeiro, and the respective manipulation surfaces and utensils used in the preparation of them, and detection of staphylococcal enterotoxin H (*seh*) and antimicrobial resistance (*mecA*) encoding genes. 50 samples were collected between January and March. After of microorganisms isolation, as established in IN62, microbial species level identification by MALDI-TOF MS were performed, as well as detection of *she* and *mecA* genes, by polymerase chain reaction (PCR). 45 of 50 samples analyzed (90%), were positive for the *Staphylococcus sp.* presence. Four isolates did not belong to *Staphylococcus* the genus, and 41 isolates of the genus, 37 were identified to species level. 40 isolates were coagulase-negative Staphylococci (CNS), and only one was coagulase-positive (CPS), and identified as *Staphylococcus aureus*. 16 from the 40 CNS isolates were identified as *S. saprophyticus* (40%), the species most frequently found among them. Species identification by MALDI-TOF MS technique proved to be accurate, due to the fact that only 4 (9%) isolates were identified at the genus level only. 13 samples were positive for the *mecA* gene, and were considered resistant by the oxacillin screening agar test. The SEH gene was detected in a unique isolate, from a slicer machine. It is concluded that CNS are widespread in the environment and may carry virulence and resistance-associated genes, and need more attention about their detection in food.

**Keywords:** *Staphylococcus*. Microbiological contamination, MALDI-TOF MS, Methicillin-resistance, *mecA*, Enterotoxin H.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES E TABELAS

Tabela 1 - Tipos de SCC <i>mec</i> de acordo com os tipos de complexo <i>ccr</i> e complexo <i>mec</i> encontrado em amostra MRSA	17
Tabela 2 - Modelo de pontuação de MALDI – TOF	21
Figura 1 - Comparação entre os tipos de Cassetes SCC <i>mec</i>	18
Figura 2 - Representação esquemática da técnica de MALDI – TOF	20



## LISTA DE ABREVIATURAS

OMS	Organização Mundial de Saúde
DTA's	Doenças Transmitidas por Alimentos
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
UAN	Unidade de Alimentação e Nutrição
EE	Enterotoxinas Estafilocócicas
SCN	Staphylococcus coagulase-negativo
SCP	Staphylococcus coagulase-positivo
CDC	Center for Diseases Control
OSP	Sensibilidade Ótima em placas / Optimum Sensitivity Plate
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> Resistente a Meticilina
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
RT – PCR	Reverse Transcriptase PCR
cDNA	DNA Complementar
RT	Transcriptase
RAPD	Random Amplified Polymorphic
AP – PCR	Arbitrarily Promed PCR
MALDI – TOF	Matrix Associated Laser Desorption Ionization Time of Flight
TSA	Agar Triptona de Soja
TSB	Caldo Soja Triptona

## SUMÁRIO

RESUMO .....	5
ABSTRACT.....	6
LISTA DE ILUSTRAÇÕES E TABELAS .....	7
LISTA DE ABREVIATURAS.....	8
1 INTRODUÇÃO .....	9
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	11
2.1 O GÊNERO <i>Staphylococcus</i> .....	11
2.2 ENTEROTOXINAS ESTAFILOCÓCICAS (EE) .....	13
2.3 DETECÇÃO DE ENTEROTOXINAS ESTAFILOCÓCICAS .....	14
2.3.1 Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) .....	15
2.3.2 Resistência a Meticilina .....	16
2.4 ESPECTROMETRIA DE MASSAS: MALDI – TOF .....	18
3 OBJETIVOS.....	22
3.1 GERAL.....	22
3.2 ESPECÍFICOS .....	22
4 DESENVOLVIMENTO.....	23
4.1 ARTIGO .....	23
RESUMO.....	23
ABSTRACT.....	24
5 CONCLUSÃO GERAL DO TRABALHO.....	43
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	44

## 1 INTRODUÇÃO

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), doenças transmitidas por alimentos (DTAs) são definidas como doença de natureza infecciosa ou tóxica causada pelo consumo de alimentos ou água contaminada (LOIR *et al.*, 2003).

Os alimentos podem sofrer contaminação de origem biológica, física ou química durante as diversas etapas do processamento, tais como: transporte, recebimento, armazenamento, produção, distribuição e consumo. Desta forma, é essencial o controle das condições higiênico – sanitárias nos locais onde os alimentos são manipulados para o consumo humano (KOCHANOSKI *et al.*, 2009).

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) todo estabelecimento onde o alimento é manipulado, preparado, armazenado e/ou exposto à venda, é considerado um serviço de alimentação (AYCICEK *et al.*, 2006). Fazem parte desse segmento as Empresas de Alimentação Coletiva, que são administradoras de restaurantes comerciais e institucionais. As unidades de trabalho onde são desenvolvidas as atividades de produção e distribuição de refeição para coletividades sadias ou enfermas são denominadas unidades de alimentação e nutrição (UAN's) (CFN, 2005). O objetivo principal dessas UANs é o de fornecer alimentação nutricionalmente equilibrada a fim de preservar ou recuperar a saúde dos seus consumidores. Desta forma, é intrínseco às atividades das UANs o conceito da inocuidade dos alimentos, representado pela qualidade higiênico – sanitária e produção de alimentos seguro (MAISTRO *et al.*, 2005).

As condições higiênicas do ambiente e de manipulação dos alimentos podem contribuir decisivamente para manutenção da qualidade dos alimentos, podendo atuar como fonte de contaminantes e/ou condições ambientais que agem como coadjuvantes no processo de contaminação e deterioração de alimentos (MAISTRO *et al.*, 2005).

A higienização adequada dos equipamentos e utensílios bem como a do próprio manipulador é um dos fatores mais importantes para o controle da qualidade do produto (GERMANO *et al.*, 2000). Mesmo os manipuladores sadios abrigam bactérias que podem contaminar os alimentos pelas mãos, trato respiratório superior e trato intestinal (ANDRADE *et al.*, 2003).

Nas indústrias alimentícias, a automação, com produção em escala e sequenciada, possibilita monitoramento e correção imediata de falhas e inconformidades de processo. Diferentemente, em UANs a lógica e as etapas de preparação dos alimentos muda diariamente de acordo com o cardápio, fazendo com que a preparação da refeição fique atrelada ao elemento humano, potencializando a probabilidade de ocorrência de falhas no

processamento de refeições que poderão comprometer a desejável qualidade final do produto fornecido (MAISTRO *et al.*, 2005).

Devido ao grande volume de refeições servidas diariamente pelas UANs, é de fundamental importância a realização de um estudo das condições microbiológicas dos utensílios utilizados na preparação dos alimentos e da qualidade do alimento servido ao consumidor, analisando os riscos de uma possível contaminação por micro-organismo.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 O GÊNERO *STAPHYLOCOCCUS*

O gênero *Staphylococcus* é composto de cocos gram-positivos, anaeróbios facultativos, imóveis e catalase positivos. As células são esféricas formando cachos de uva e apresentam parede celular resistente a lisozima e sensível a lisostafina (LOIR *et al.*, 2003). O diâmetro varia entre 0,5 e 1,5  $\mu\text{m}$ , e não formam esporos, possuem metabolismo fermentativo e respiratório, são mesófilos, com temperatura de crescimento entre 7 e 47,8 °C e temperatura ótima entre 30 e 37°C, seu pH ideal para crescimento é entre 7 a 7,5, porém eventualmente ocorre sua multiplicação em alimentos com pH na faixa entre 4,2 e 9,3. São capazes de sobreviver e se multiplicar em uma concentração de cloreto de sódio de até 15%, sendo capazes de se multiplicarem em substratos com baixos níveis de atividade de água (em torno de 0,86, com relatos de crescimentos em atividade de água de 0,83) (FRANCO *et al.*, 2005). Os *Staphylococcus* são resistentes a bacitracina, oxidase-negativos, o que permite diferenciá-los de outros gêneros como *Kocuria*, *Rothia* e *Stomatococcus* (BANNERMAN & PEACOCK, 2007). O gênero é composto por 52 espécies e 28 subespécies (LPSN, 2016).

O gênero é dividido em dois grupos com base na produção da enzima coagulase, sendo estes: *Staphylococcus* coagulase - positivos (SCP) e *Staphylococcus* coagulase-negativos (SCN). Dentro do grupo dos SCP, encontramos o *S. aureus*, patógeno mais descrito e com potencial virulento elevado, além de outros, como *S. delphini*, *S. intermedius*, *S. schleiferi* subsp. *coagulans* e algumas cepas de *S. hyicus*. Os SCN são distinguidos dos SCP pela sua incapacidade de coagular plasma de coelho (TRABULSI *et al.*, 2002). A enzima coagulase promove a transformação do fibrinogênio em fibrina e consequente coagulação do plasma sanguíneo (WONG *et al.*, 2002; PEREIRA *et al.*, 2000). Dentro do grupo dos SCN encontramos espécies como *S. auricularis*, *S. capitis*, *S. caprae*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. lugdunensis*, *S. hominis*, *S. saprophyticus*, *S. simulans* e *S. xylosus*, sendo estas duas últimas espécies citadas adquiridas de animais domésticos (BANNERMAN & PEACOCK, 2007).

Devido à variedade de mecanismos de virulência conhecidos, *S. aureus* é considerado como um dos patógenos humanos mais versáteis, podendo causar doenças através da sua capacidade de multiplicação e ampla disseminação pelos tecidos, bem como através da produção de substâncias extracelulares (ARCHER, 1998). Algumas dessas substâncias são toxinas que atuam através de diferentes mecanismos, como toxinas citolíticas, enterotoxinas, toxina do choque tóxico (TSST – 1) e toxinas esfoliativas (PROJAN

& NOVICK, 1997), esta última senão a responsável pela síndrome de Ritter. Outras substâncias descritas são enzimas como: coagulase, catalase, desoxirribonuclease, hialuronidase, lipase, proteases e estafiloquinase, sendo estas substâncias que auxiliam a invasão do hospedeiro (TRABULSI, TEIXEIRA & BUERIS, 2004).

Os SCN constituem um grupo, no qual é encontrada a maior parte das espécies do gênero *Staphylococcus* (BANNERMAN & PEACOCK, 2007). Em comparação com os SCP, eles raramente são patogênicos, sendo considerados por muitos autores como patógenos oportunistas (LOIR *et al.*, 2003), porém alguns estudos descobriram que certas estirpes de SCN são capazes de produzir enterotoxinas e assim levar a intoxicação alimentar. Entre os SCN, algumas espécies são conhecidas por desempenhar um importante papel na fermentação de produtos cárneos (HENNEKINNE *et al.*, 2011).

A capacidade desses micro-organismos em causar infecções tornou-se mais evidente nas últimas décadas, a partir da crescente utilização de recursos mais modernos e invasivos de diagnóstico e terapêutica, bem como em função da utilização de cateteres, marcapassos e próteses articulares, normalmente associado à capacidade de formação de biofilme desses micro-organismos (GARCIA *et al.*, 2004). Este fato, aliado a fatores como doença de base grave, tempo de hospitalização prolongado, uso de imunodepressores e idade avançada do hospedeiro contribuíram para que os SCN se tornassem importantes agentes de infecções hospitalares (CAVALCANTI *et al.*, 2005).

*Staphylococcus epidermidis* é a espécie mais isolada de bacteriemias, sendo a de maior importância entre os SCN (GARCIA *et al.*, 2004). Esta espécie também tem sido isolada de endocardites, de infecções de sítio cirúrgico e do trato urinário, de fluido cérebro-espinhal, de próteses articulares e cateter intravascular, dentre outras (CUNHA *et al.*, 2004; BANNERMAN & PEACOCK, 2007).

Outra espécie muito frequente como agente etiológico de bacteriemias é *S. haemolyticus*, tendo sido implicada também em casos de endocardites, septicemias, peritonites, infecções geniturinárias, ósseas e articulares (SPANU *et al.*, 2003; OTTO, 2004). Relatos recentes têm relacionado esta espécie a bacteriemias associadas a várias complicações, mostrando sua significância clínica (RUHE *et al.*, 2004). Esta espécie também é conhecida por sua maior resistência à oxacilina entre os SCN e, freqüentemente, têm apresentado concentrações mínimas inibitórias (CMIs) para glicopeptídeos mais elevadas do que outras espécies (ING, BADDOUR & BAYER, 1997).

*S. saprophyticus* que é o segundo patógeno mais isolado em infecções urinárias comunitárias, principalmente, de mulheres com idade entre 16 e 35 anos (HUEBNER & GOLDMANN, 1999). Outra espécie muito isolada de infecções clínicas é *S. hominis* (JARLOV, 1999; ARCHER, 2000). *S. lugdunensis* e *S. schleiferi* são espécies encontradas em menor frequência e estão associadas a infecções de ferida cirúrgica e infecções

relacionadas a cateter (LAMBE *et al.*, 1990). Outras espécies de *Staphylococcus* como *S. schleiferi* e *S. warneri* são isoladas em menor frequência de infecções nosocomiais (BANNERMAN & PEACOCK, 2007).

O homem e os animais são os principais reservatórios de *S.aureus*, sendo a cavidade nasal do homem seu principal habitat (FRANCO *et al.*, 2005) e pode ser encontrado em 30 a 50% dos indivíduos saudáveis (LOIR *et al.*, 2003). É a partir da cavidade nasal que o micro-organismo atinge a epiderme, ar, água, solo, alimentos ou qualquer outro objeto que entre em contato com o indivíduo. Os portadores nasais de *S. aureus* ao manipularem alimentos podem se tornar importante fonte de contaminação para os alimentos (FRANCO *et al.*, 2005). Os SCN fazem parte da microbiota normal da pele e mucosa, porém podem causar infecções oportunistas: penetração por lesões cutâneas originadas por traumas ou procedimentos médicos invasivos. Já são considerados como os principais agentes de bacteremia de origem hospitalar e infecções pela presença de corpos estranhos. Os indivíduos mais susceptíveis são os imunocomprometidos, doentes crônicos, idosos e prematuros (CUNHA *et al.*, 2002).

## 2.2 ENTEROTOXINAS ESTAFILOCÓCICAS (EE)

A intoxicação alimentar estafilocócica é uma das doenças transmitidas por alimento mais comum no mundo e ocorre após a ingestão de enterotoxinas estafilocócicas (EE), que são produzidas por estirpes enterotoxigênicas de *Staphylococcus sp.*, principalmente *S. aureus* e muito ocasionalmente por outras espécies de estafilococos, tais como *S. intermedius* (HENNEKINNE *et al.*, 2011).

São proteínas globulares de cadeia simples com pesos moleculares variando de 22 a 29 kDa. Algumas enterotoxinas apresentam estruturas cristalinas, revelando homologia significativa em conformações secundárias e terciárias (SEA, SEB, SEC, SEH), enquanto que outras podem ser divididas em quatro grupos de filogenética com base na sequência do seu aminoácido primário (SES, SE-like) (HENNEKINNE *et al.*, 2011).

As Enterotoxinas Estafilocócicas são resistentes às condições do meio ambiente (congelamento, secagem, tratamento térmico e pH baixo), que podem destruir as estirpes produtoras de enterotoxinas. Também são resistentes às enzimas proteolíticas, conservando sua atividade no trato digestivo após sua ingestão (HENNEKINNE *et al.*, 2011).

Depois de ingeridas, as EEs ligam-se aos seus receptores que estão localizados no intestino, gerando estímulos que são transferidos através do nervo vago e simpático, induzindo o retroperistaltismo do estômago e do intestino delgado e atingindo o centro do vômito. O outro mecanismo sugerido e pouco elucidado, parece se relacionar a ativação de

um mecanismo secretor de sódio e cloro, provocando um desequilíbrio hidroeletrolítico no intestino, por consequência ocasionando a diarreia (FRANCO *et al.*, 2005).

O período de incubação e a gravidade dos sintomas dependem da quantidade de enterotoxinas ingerida e da susceptibilidade do indivíduo. Os sintomas de náuseas e vômitos, aparecem dentro de 30 minutos e 8 horas (média de 3 horas) após a ingestão do alimento contaminado. O indivíduo também pode cursar com dor abdominal, diarreia, tontura, tremores e fraqueza geral, por vezes associados um uma febre moderada quando ocorre a ingestão de uma grande quantidade de toxina. Nos casos mais graves, dores de cabeça, prostração e pressão arterial baixa podem ocorrer. A recuperação ocorre no período de 24 – 48 horas, sem tratamento específico. A morte é rara (0,02%), podendo ocorrer em indivíduos mais susceptíveis à desidratação, como crianças e idosos (HENNEKINNE *et al.*, 2011).

O diagnóstico da intoxicação estafilocócica é feito basicamente por dois aspectos: sintomatologia e presença da EEs no alimento (NAJERA – SANCHES *et al.*, 2003). A intoxicação estafilocócica raramente é letal, sendo que as fatalidades da intoxicação ocorrem ocasionalmente em indivíduos debilitados imunologicamente e idosos são mais susceptíveis do que os jovens. Em determinados casos, a intoxicação alimentar estafilocócica pode causar morte devido a complicações secundárias (FRANCO *et al.*, 2005). É necessário considerar que não apenas *S. aureus*, mas também espécies coagulase positiva e negativa podem produzir enterotoxinas e, assim, representarem perigo quando presentes em alimentos (PEREIRA *et al.*, 2005).

### 2.3 DETECÇÃO DE ENTEROTOXINAS ESTAFILOCÓCICAS

O maior problema na identificação da EEs em alimentos é a pequena quantidade que é encontrada no alimento relacionado a surtos de intoxicação alimentar. O primeiro teste sorológico desenvolvido foi o método de imunodifusão baseado na reação em gel da enterotoxina com anticorpo específico, formando uma linha de precipitação (WONG *et al.*, 2002). A técnica de “*Optimum Sensitivity Plate – OSP*” (Sensibilidade ótima em Placa) permite a detecção de 0,5 µg de EE/mL, sendo sua sensibilidade adequada para a maioria das cepas enterotoxigênicas (PEREIRA *et al.*, 2002). A técnica de OSP foi desenvolvida com o objetivo de promover um teste com maior sensibilidade, de maneira a não comprometer a visualização da linha de precipitação. O método de imunodifusão em microlâminas (“microslide”) é o mais sensível na imunodifusão em gel, tendo a capacidade de detectar de 0,05 a 0,1 µg/mL, embora apresente resultados de difícil interpretação. A técnica de ensaios imuno - bioquímicos (Enzyme – Linked Imuno Sorbance Assay –ELISA) foram desenvolvidas (SANTOS, 2003) para pesquisas de enterotoxinas em alimentos e



estão disponíveis uma série de kits comerciais sendo a maioria baseado nesta técnica e com sensibilidade variando de 0,1 a 1 ng/mL. Técnicas como a Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) podem ser aplicadas para detecção de diversos tipos de estafilococos enterotoxigênicos em culturas e alimentos (WONG *et al.*, 2002).

Métodos baseados na amplificação de DNA (PCR) podem demonstrar a presença de linhagens de *S. aureus* toxigênicas, antes da expressão das toxinas, com base nas seqüências específicas dos genes e desta forma detectarem a fonte potencial de contaminação (WONG *et al.*, 2002).

### 2.3.1 Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)

Esse método é utilizado para amplificação de uma determinada região do DNA alvo. O DNA pode ser genômico sendo este de bactérias, leveduras, mamíferos e plantas - ou plasmidial - exclusivo de bactérias. É capaz de detectar genes que codificam enterotoxinas em estirpe de *Staphylococcus aureus* isolado a partir de alimentos contaminados. No entanto, este método apresenta duas limitações: primeiro, as cepas de estafilococos devem ser isoladas a partir de alimentos e, em segundo, os resultados informam a presença ou ausência de genes que codificam enterotoxinas estafilocócicas, porém não fornece nenhuma informação sobre a expressão desses genes nos alimentos. Este método não deve ser o único utilizado para confirmar *Staphylococcus aureus* como agente causador em surto. No entanto, o PCR é um método altamente sensível e rápido para caracterização de estirpes de *Staphylococcus aureus* envolvidos em intoxicação alimentar estafilocócica, proporcionando assim informações valiosas (HENNEKINNE *et al.*, 2011).

Modificações da técnica PCR básica já são amplamente difundidas, a RT-PCR (*reverse transcriptase* PCR) desenvolvida para amplificar RNA, onde nesse processo o RNA alvo é primeiramente convertido em DNA complementar (cDNA) pela ação de uma enzima transcriptase (RT) e este cDNA é amplificado por PCR (TANG; PERSING, 1999). Já a *nested* PCR, é a técnica onde são realizados variados ciclos de amplificação com um grupo de *primers* e o produto dessa amplificação é amplificado, utilizando-se outro grupo de *primers* dirigidos para uma seqüência amplificada pelo primeiro grupo de *primers*. Se tratando do Polimorfismo de seqüências de DNA amplificadas ao acaso ou DNA polimórfico amplificado ao acaso (RAPD, *random amplified polymorphic* DNA ou AP-PCR, *arbitrarily primed* PCR), ocorre o uso de um único e pequeno *primer*, escolhido para amplificar DNA genômico em condições de baixa estringência, não sendo necessário o conhecimento prévio da região da ligação do *primer*. Apenas as regiões genômicas entre duas seqüências flanqueantes ao *primer* será amplificada, outra modificação se trata do Real time PCR, ou

PCR em tempo real, que consiste em um sistema combinado à utilização de um termociclador automatizado, com a habilidade de detectar, em tempo real, sequências alvo com o uso de sondas fluorescentes emitindo sinal quando formados os produtos híbridos. Por fim a técnica na qual se utiliza mais de um par de *primers* na mesma reação, o multiplex – PCR, possibilitando a amplificação simultânea de mais de uma sequência de DNA (TANG; PERSING, 1999).

### 2.3.2 Resistência a Meticilina

Os *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina, geralmente referido pelas siglas MRSA (do inglês *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*) ou ORSA (do inglês *Oxacillin-resistant Staphylococcus aureus*) são estirpes que se tornaram resistentes a vários antibióticos - primeiramente à penicilina, em 1947, e, logo depois, a meticilina e demais agentes antimicrobianos, tanto  $\beta$ -lactâmicos quanto de outras classes (ACHIM, 2011). A evolução de tal resistência não torna o micro-organismo intrinsecamente mais virulento do que as estirpes de *S. aureus* sensíveis a antibióticos, porém a resistência faz com que a infecção por MRSA seja mais difícil de tratar com os tipos padrão de antibióticos e, assim, mais perigosos (HUSSEIN, *et al.*, 2015)

A resistência a meticilina e outros antibióticos  $\beta$ -lactâmicos em estirpes de MRSA é ocasionada pela expressão de um gene contido no genoma destes, denominado *mecA* (HUSSEIN *et al.*, 2015). O gene *mecA* encontra-se inserido em um cassete cromossômico *mec*, presente nos *Staphylococcus* (“Staphylococcal Cassette Chromosome *mec*” – SCC*mec*), que é caracterizado pela presença de genes que codificam as recombinases CcrA e CcrB, as sequências terminais invertidas reconhecidas por estas recombinases e pelo complexo do gene *mecA*, que inclui tanto o gene *mecA*, como os genes *mecI* e *mecR1*, reguladores da transcrição do gene *mecA* (HIRAMATSU *et al.*, 2001).

Segundo dados do “Internacional Working Group on the Staphylococcal Cassette Chromosome elements” (disponível em [www.sccmec.org](http://www.sccmec.org) IWG – SCC, 2016), já foram descritos 11 tipos de SCC*mec* apresentando combinações diferentes de seis classes do complexo do gene *mec* (A, B, C1, C2, D, E) e de oito tipos de complexo *ccr* (IWG – SCC, 2016).

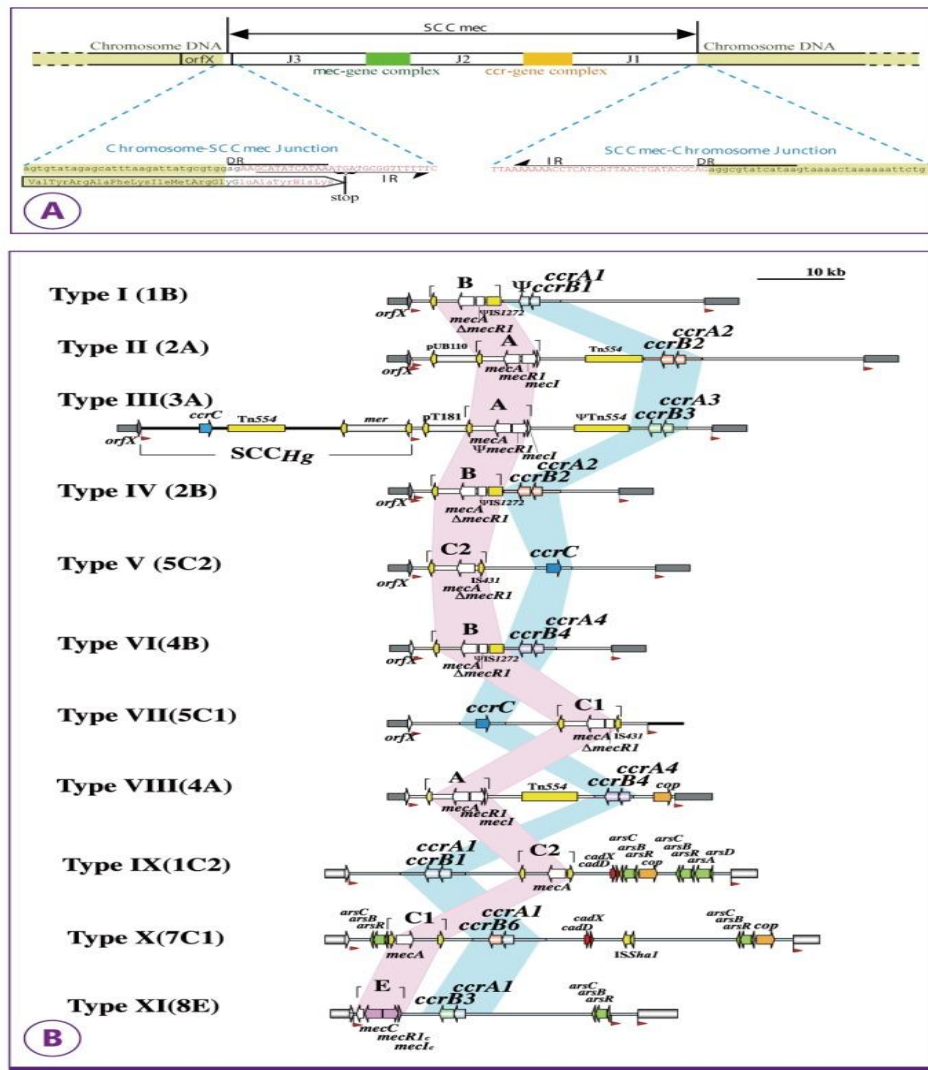
**Tabela 1 - Tipos de SCCmec de acordo com os tipos de complexo ccr e complexo mec encontrado em amostra MRSA**

<b>Tipos de SCCmec</b>	<b>Tipo de Complexo ccr</b>	<b>Tipo de Complexo mec</b>
I	1(A1B1)	B
II	2(A2B2)	A
III	3(A3B3)	A
IV	2(A2B2)	B
V	5(C1)	C2
VI	4(A4B4)	B
VII	5(C1)	C1
VIII	4(A4B4)	A
IX	1(A1B1)	C2
X	7(A1B6)	C1
XI	8(A1B3)	E

Disponível em [www.sccmec.org-\(IWG-SCC](http://www.sccmec.org-(IWG-SCC), 2016)

Os SCCmec tipos I, II, III, VI e VIII normalmente estão associados a amostras de origem hospitalar ou IRAS, enquanto amostras que apresentam o SCCmec dos tipos IV, V e VII são de origem comunitária (ITO *et al.*, 2004; OLIVEIRA, MILHEIRIÇO & DE LENCASTRE, 2006; CHRISTIANSON *et al.*, 2007). Os SCCmec tipos IX, X e XI foram descritos em 2011 em algumas estirpes comunitárias isoladas no Japão (tipos IX e X) (LI *et al.*, 2011) e na Irlanda (tipo XI) (SHORE *et al.*, 2011) e ainda permanecem restritos aos seus países de origem.

Figura 1 - Comparação entre os tipos de Cassetes SCCmec



Fonte: [www.researchgate.net](http://www.researchgate.net)

## 2.4 ESPECTROMETRIA DE MASSAS: MALDI – TOF

A espectrometria de massas é uma técnica analítica poderosa utilizada para identificar compostos desconhecidos, quantificar compostos conhecidos e elucidar a estrutura e as propriedades químicas das moléculas. Basicamente, esta técnica consiste na ionização de átomos ou moléculas (quebrar os átomos ou moléculas para que fiquem carregadas com mais ou menos elétrons do que o original). De uma amostra, na separação

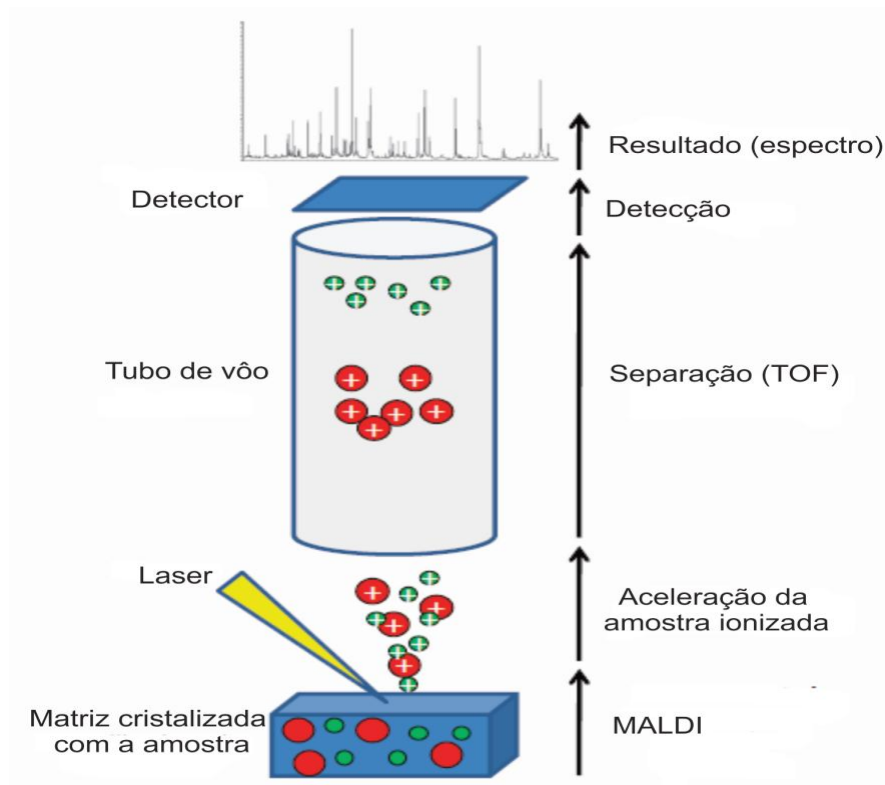
destes átomos ou moléculas em função da sua relação massa/ carga ( $m/z$ ) e em seguida sua identificação e quantificação (GOULART, RESENDE, 2013).

A sigla MALDI-TOF significa *Matrix Associated Laser Desorption – Ionization – Time of Flight* e consiste em um sistema no qual o material biológico (uma colônia ou uma concentrado de hemocultura) é colocado em uma placa em quem há a matriz polimérica. O material é irradiado com um laser que vaporiza a amostra e há ionização de várias moléculas, que são aspiradas num tubo de vácuo e levadas a um detector: conforme a molécula, o tempo de chegada ao detector (*time of Flight*) é diferente. Esses dados são colocados em um gráfico, mostrando vários picos e, para cada espécie bacteriana ou fúngica, obtém-se um gráfico específico. Uma base de dados computadorizada interpreta e fornece o resultado com rapidez. Trata-se, portanto, de uma aplicação da espectrometria de massas (PASTERNAK,2012).

Resumidamente, a técnica de MALDI-TOF MS consiste na deposição de uma determinada amostra em uma matriz capaz de fornecer prótons para o processo de ionização dos componentes da amostra. Quando esta matriz absorve a energia emitida por um laser, ocorre a transferência de prótons da matriz para os componentes da amostra e ao mesmo tempo desencadeia-se um processo de dessorção, o que possibilita a passagem da amostra do estado sólido para o gasoso. Dessorção é um fenômeno pelo qual uma substância é liberada através de uma superfície. O processo é oposto de sorção (isto é, adsorção e absorção ocorrendo simultaneamente). Como tal, é o efeito de gases ou líquidos a serem incorporados num material de um estado diferente e aderente à superfície de outra molécula. A absorção é a incorporação de uma substância em um estado, para outros estado diferente (por exemplo, líquidos a serem absorvidos por um sólido, ou gases a serem absorvidos por um líquido). Adsorção é a adesão física ou ligação de íons a moléculas na superfície de outra molécula. O processo inverso da sorção é a dessorção.

Os componentes da amostra ionizados e dessorvidos são direcionados para o analisador TOF, onde são acelerados através de um campo elétrico dentro de um tubo a vácuo (sem qualquer gás ou molécula presente), até que atinja o detector. Neste tubo a vácuo, os componentes da amostra são separados de acordo com  $m/z$ , chegando ao detector em diferentes tempos (Figura 2) (GOULART; RESENDE, 2013).

**Figura 2 - Representação esquemática da técnica de MALDI – TOF MS**



Adaptado de: Croxatto, A., G. Prod'hom, and G. Greub, *Applications of MALDI-TOF massspectrometry in clinical diagnostic microbiology*. FEMS Microbiol Rev, 2012. 36(2): p. 380-407.

MALDI-TOF MS tem sido utilizada com sucesso na investigação e identificação de proteínas e peptídeos, na identificação taxonômica de micro-organismos, na genotipagem e análise de polimorfismos no DNA, na investigação de modificações pós – transcricionais no RNA, dentre inúmeras outras aplicações. Por se tratar de uma técnica de alta sensibilidade e de alto rendimento (uma amostra pode ser analisada em poucos minutos), novas abordagens vêm sendo desenvolvidas para atender a necessidade de diagnósticos rápidos e preciso para diversas doenças (GOULART; RESENDE, 2013).

O modelo de pontuação do MALDI-TOF MS segue a seguinte classificação descrita na tabela 2.

Tabela 2 - Modelo de pontuação de MALDI – TOF MS

Variação	Descrição	Símbolo	Coloração
2,3 – 3,0	Grande probabilidade de identificação da espécie	(+++)	Verde
2,0 – 2,299	Seguro para identificação de gêneros e provável identificação da espécie	(++)	Verde
1,7 – 1,999	Provável identificação do gênero	(+)	Amarelo
0,0 - 1,699	Identificação não confiável	(-)	Vermelho

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 GERAL

Determinar a prevalência de *Staphylococcus sp.* isolados de amostras de alimentos produzidos por uma cozinha industrial de uma rede de supermercados do Rio de Janeiro e dos seus respectivos utensílios, e detectar a presença dos genes *mecA* e *seh*.

#### 3.2 ESPECÍFICOS

- Pesquisar qualitativamente a presença de *Staphylococcus sp.* durante o preparo de refeições produzidas na referida cozinha industrial de uma rede de supermercados;
- Identificar as amostras isoladas a nível de espécie através de metodologia fenotípica (testes bioquímicos) e espectrometria de massas (MALDI-TOF MS);
- Pesquisar a presença dos genes *mecA* (que codifica resistência a  $\beta$ -lactâmicos) e *seh* (que codifica a enterotoxina H, através da técnica de PCR).



## 4 DESENVOLVIMENTO

### 4.1 ARTIGO

#### DETECÇÃO E PREVALÊNCIA DOS GENES *mecA* e *seh* DE *Staphylococcus sp.* ISOLADOS DE AMOSTRAS DE ALIMENTOS, SUPERFÍCIES E UTENSÍLIOS DE UMA COZINHA INDUSTRIAL DO RIO DE JANEIRO

Paula Lisbôa Nascimento<sup>1</sup>; Juan Pinheiro de Oliveira Martinez<sup>1</sup>; Tânia Barbosa Netto<sup>1</sup>,  
Matheus Mikio Takeyama<sup>2</sup>, Kátia Regina Netto dos Santos<sup>2</sup>; Eliezer Menezes Pereira<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro – Campus Rio de Janeiro/RJ

<sup>2</sup>Instituto de Microbiologia Paulo de Goês – Universidade federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro/RJ

Corresponding author: eliezer.pereira@ifrj.edu.br

#### RESUMO

A contaminação microbiológica de alimentos tem sido alvo de constantes mudanças nos procedimentos de controle higiênico sanitário na produção de alimentos e as empresas necessitam de um controle de qualidade eficaz e eficiente em todo processo produtivo. Os *Staphylococcus* são micro-organismos cada vez mais associados a intoxicações alimentares, devida a produção de enterotoxinas. Estirpes multirresistentes, principalmente o MRS (*Staphylococcus spp.* Resistente a metilina) tem cada vez mais sido isolados e descritos em infecções humanas, e são um problema grave de saúde pública. Este trabalho teve como objetivo determinar a prevalência e detectar fatores de virulência e resistência de *Staphylococcus spp.* isolados de amostras de alimentos produzidos em uma cozinha industrial de uma rede de supermercados do Rio de Janeiro, bem como dos respectivos utensílios e superfícies de manipulação utilizados no preparo dos mesmos, e analisar a presença de genes codificadores da enterotoxina estafilocócica H (*seh*) e de resistência a antimicrobianos (*mecA*). Foram coletadas 50 amostras entre janeiro e março de 2016. Após o isolamento dos micro-organismos, conforme preconizado na IN62, foram realizadas a caracterização das amostras através de identificação a nível espécie dos isolados por MALDI-TOF MS, a identificação dos genes *seh* e *mecA*, pelo método de reação em cadeia da polimerase (PCR). Das 50 amostras analisadas, 45 (90%) foram positivas para presença de *Staphylococcus sp.*. Quatro amostras não pertenciam ao gênero *Staphylococcus*, sendo que das 41 amostras pertencentes ao gênero, 37 foram identificadas a nível de espécie, sendo que 40 amostras eram *Staphylococcus* coagulase-negativo (SCN), e apenas uma era coagulase-positiva (SCP), sendo identificada como *Staphylococcus aureus*. Das 40 amostras de SCN, 16 eram *S. saprophyticus* (40%), sendo a espécie mais encontrada dentre este grupo. A identificação das espécies pela técnica de MALDI-TOF MS demonstrou ser acurada, pois apenas 4 (9%) foram identificadas apenas a nível de gênero. 13 amostras foram positivas para o gene *mecA*, e foram consideradas resistentes pela técnica de *screening* em Agar com oxacilina. O gene *seh* fora detectado em uma amostra de isolada de fatiadora de frios. Conclui-se que os SCN encontram-se disseminados no ambiente, e podem carrear genes associados a resistência e precisam ter maior atenção no que diz respeito a sua detecção em alimentos.

**Palavras – chave:** *Staphylococcus*, Contaminação microbiológica, MALDI TOF MS, Resistência a metilina, *mecA*, Enterotoxina H

## ABSTRACT

Food microbiological contamination has been the subject of constant changes in sanitary control procedures involving food production, and companies need an effective and efficient quality control throughout the production process, and the binomial time / temperature of these controls should be as thorough as possible to monitor this type of service. Staphylococcus are microorganisms which are increasingly associated with food poisoning, due to the enterotoxins production. Multiresistant strains, mainly MRS (Methicillin-resistant *Staphylococcus spp.*) has increasingly been isolated and described in human infections, being a serious public health problem. This study aimed to determine the prevalence and detection of virulence and resistance factors of *Staphylococcus spp.* Isolated from food samples produced in an industrial kitchen of a supermarket chain in Rio de Janeiro, and the respective manipulation surfaces and utensils used in the preparation of them, and detection of staphylococcal enterotoxin H (*seh*) and antimicrobial resistance (*mecA*) encoding genes. 50 samples were collected between January and March. After of microorganisms isolation, as established in IN62, microbial species level identification by MALDI-TOF MS were performed, as well as detection of *she* and *mecA* genes, by polymerase chain reaction (PCR). 45 of 50 samples analyzed (90%), were positive for the *Staphylococcus sp.* presence. Four isolates did not belong to *Staphylococcus* the genus, and 41 isolates of the genus, 37 were identified to species level. 40 isolates were coagulase-negative *Staphylococci* (CNS), and only one was coagulase-positive (CPS), and identified as *Staphylococcus aureus*. 16 from the 40 CNS isolates were identified as *S. saprophyticus* (40%), the species most frequently found among them. Species identification by MALDI-TOF MS technique proved to be accurate, due to the fact that only 4 (9%) isolates were identified at the genus level only. 13 samples were positive for the *mecA* gene, and were considered resistant by the oxacillin screening agar test. The SEH gene was detected in a unique isolate, from a slicer machine. It is concluded that CNS are widespread in the environment and may carry virulence and resistance-associated genes, and need more attention about their detection in food.

**Keywords:** *Staphylococcus*. Microbiological contamination, MALDI-TOF MS, Methicillin-resistance, *mecA*, Enterotoxin H.

## INTRODUÇÃO

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), doenças transmitidas por alimentos (DTAs) são definidas como doença de natureza infecciosa ou tóxica causada pelo consumo de alimentos ou água contaminada (LOIR *et al.*, 2003). As condições higiênicas do ambiente e da cozinha podem contribuir decisivamente para manutenção da qualidade dos alimentos, podendo atuar como fonte de contaminantes e/ou condições ambientais que agem como coadjuvantes no processo de contaminação e deterioração de alimentos (MAISTRO *et al.*, 2005). A higienização adequada dos equipamentos e utensílios bem como a do próprio manipulador é um dos fatores mais importantes para o controle da qualidade do produto (GERMANO *et al.*, 2000). Mesmo os manipuladores sadios abrigam bactérias que podem contaminar os alimentos pelas mãos, trato respiratório superior e trato intestinal (ANDRADE *et al.*, 2003).

O gênero *Staphylococcus* compreende cocos gram-positivos, anaeróbios facultativos, imóveis e catalase positiva (LOIR *et al.*, 2003), sendo dividido em dois grupos com base na produção de coagulase, sendo estes *Staphylococcus* coagulase positivos (SCP) e *Staphylococcus* coagulase negativos (SCN). Dentro do grupo dos SCP, encontramos o *S. aureus*, patógeno mais descrito e com potencial virulento elevado, além de outros, como *S. delphini*, *S. intermedius*, *S. schleiferi*, *S. coagulans* e algumas cepas de *S. hyicus*.

A intoxicação alimentar estafilocócica é uma das doenças transmitidas por alimentos mais comuns no mundo e ocorre após a ingestão de Enterotoxinas Estafilocócicas (SE, Staphylococcal Enterotoxins), que são produzidas por estirpes enterotoxigênicas de *Staphylococcus*, principalmente *S. aureus* e muito ocasionalmente por outras espécies de estafilococos, tais como *S. intermedius* (HENNEKINNE *et al.*, 2011). As enterotoxinas estafilocócicas são os principais agentes de intoxicação de origem bacteriana no homem e têm sido relatadas em vários surtos de doenças transmitidas por alimentos. As toxinas são termoestáveis (CLIVER, 1994) e originam sintomas como vômito e diarreia, dentre outros (BERGDOLL, 1990).

Sato'o e Colaboradores (2015) detectaram a produção considerável em produtos cárneos após a incubação de SEA e SEH, onde a SEA foi detectado em algumas amostras e a SEH em todas as amostras incubadas. A quantidade de SEH detectada foi semelhante a de SEA, que é a enterotoxina mais potente dentre as SE's. O estudo sugeriu que a SEH está relacionada a surtos de intoxicação alimentar estafilocócica.

Os *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina, geralmente referido pelas siglas MRSA (do inglês *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*) ou ORSA (do

inglês *Oxacillin-resistant Staphylococcus aureus*) são patógenos que se tornaram resistentes a diversos antimicrobianos – primeiramente à penicilina, em 1947, e, logo depois, à metilina (ACHIM, 2011). Os sintomas de uma infecção por MRSA podem progredir substancialmente no período de 24-48 horas (HUSSEIN *et al.*, 2015).

A resistência a metilina e outros antibióticos  $\beta$ -lactâmicos em estirpes de MRSA é ocasionada pela expressão de um gene contido no genoma destes, denominado *mecA* (HUSSEIN *et al.*, 2015). Este gene está contido em um cassete cromossômico de 21 a 60 kb denominado *SCCmec*, um elemento genético móvel que pode também conter estruturas genéticas tais como Tn554, pUB110, pT181 (ITO *et al.*, 1998). Após a aquisição do gene *mecA*, o mesmo deve ser integrado e localizado no cromossoma de *S. aureus*, e codifica uma proteína de ligação à penicilina alterada, denominada PBP2a, que difere de outras proteínas de ligação à penicilina (LOWY, FD, 2003). Segundo dados do “Internacional Working Group on the Staphylococcal Cassette Chromosome elements” (disponível em [www.sccmec.org](http://www.sccmec.org) IWG – SCC, 2016), já foram descritos 11 tipos de *SCCmec* apresentando combinações diferentes de seis classes do complexo do gene *mec* (A, B, C1, C2, D, E) e de oito tipos de complexo *ccr* (IWG – SCC, 2016).

Este trabalho teve como objetivo identificar amostras de *Staphylococcus sp.* isolados de alimentos produzidos por uma cozinha industrial de uma rede de supermercados do Rio de Janeiro e dos seus respectivos utensílios, e detectar genes associados a resistência a antimicrobianos (*mecA*) e produção de enterotoxinas (*seh*).

## **METODOLOGIA**

Foram coletadas cento e dez amostras de alimentos e dos utensílios utilizados em uma cozinha industrial de uma rede de supermercados do Rio de Janeiro, de janeiro a março de 2016. Para a coleta dos alimentos foram utilizados sacos esterilizados do tipo *stomacher* e para pesquisa de contaminação dos utensílios utilizados nos preparos dos alimentos utilizou-se *swabs* estéreis para coleta. As amostras foram acondicionadas em bolsa térmica com blocos de gelo e transportadas até o Laboratório de Microbiologia do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ), Campus Maracanã, onde as análises foram realizadas.

Das amostras coletadas, cinquenta amostras foram utilizadas como representativas para o desenvolvimento do trabalho. Como um mesmo tipo de alimento ou utensílios foram coletados por mais de uma vez em dias diferentes, eliminou-se as que se repetiam, independente dos dias, e levando em consideração o potencial de possível contaminação de

cada amostra. Os alimentos, utensílios e superfícies analisados estão listados nas Tabelas 1 e 2.

Para isolamento de *Staphylococcus* em alimentos, 25 gramas do alimento em questão foram suspensos em 225 mL de água peptonada estéril, sendo posteriormente homogeneizados em *stomacher*. Após este procedimento, 0,1 mL da suspensão foram inoculadas em ágar Baird-Parker (Himedia) para isolamento de colônias típicas de *Staphylococcus* (BRASIL, 2003). Não foram realizados os plaqueamentos de diluições subsequentes, devido ao caráter qualitativo da análise. Foram consideradas as amostras com mais de 30 colônias típicas crescidas em placa (que acarreta o mínimo de  $3,0 \times 10^3$  UFC/g) como determinantes para amostra ser considerada positiva (BRASIL, 2003).

Para análise de utensílios e superfícies, após coleta de amostras utilizando *swab* estéril, estes foram semeados em Agar Manitol Salgado, realizando-se a técnica de esgotamento (método qualitativo), e após semeadura estas foram a  $36 \pm 2^\circ \text{C} / 18 - 24 \text{ h}$  para posterior análise visual, onde as amostras com colônias características de estafilococos foram semeadas para placas contendo o TSA (Agar Triptona de Soja, Himedia) e incubadas em estufa a  $36 \pm 2^\circ \text{C} / 18 - 24 \text{ h}$  para crescimento e isolamento. As amostras foram estocadas em criotubos contendo 0,8 mL de TSB (Caldo Soja Triptona, Himedia) e 0,2 mL de Glicerina, a  $-20^\circ \text{C}$ .

Conforme preconizado pela Instrução Normativa nº 62 que regulamenta os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água (BRASIL, 2003), para a caracterização do gênero *Staphylococcus* foram realizados os testes de coloração de Gram e prova da catalase. Após esta análise, foi realizada prova de coagulase, para avaliar se as amostras eram pertencentes ao grupo de SCP.

Para identificação das espécies de *Staphylococcus* isoladas, estas foram inoculadas em TSA por 24 h, e transferidas para uma placa de 96 poços para serem submetidas a Espectrometria de Massas (MALDI-TOF MS - Bruker, modelo Microflex LT), onde as amostras foram aplicadas em duplicata.

Para pesquisa dos genes *mecA* e *seh*, a liberação do DNA bacteriano foi realizada por lise térmica.

A detecção do gene *seh*, que codifica a enterotoxina estafilocócica H, foi realizada através da técnica de PCR, conforme descrito por Sila e colaboradores (2009). A amplificação foi realizada em uma termocicladora (Applied Biosystems/Veriti 96 Well Thermal Cycler, EUA), utilizando-se um volume total de 25  $\mu\text{L}$  para a reação composta de 3  $\mu\text{L}$  de DNA liberado por lise térmica, 100  $\mu\text{M}$  de cada deoxinucleotídeo trifosfatado (dATP, dGTP, dCTP e dTTP) (Life Technologies, São Paulo, Brasil), 0,8  $\mu\text{M}$  dos oligonucleotídeos

SEH<sub>F</sub> (5'-CAACTG CTGATTTAGCTCAG-3') e SEH<sub>R</sub> (5'-GTCGAATG AGTAATCTCTAGG-3') (Biotools, Madri, Espanha), 2,5 µL do tampão da enzima 10x (10 mM Tris HCl, 25mM KCl) e 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>. Após realização de uma etapa de desnaturação inicial de 94°C por 5 min, 40 ciclos de amplificação foram realizados: desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento a 56°C por 1 min e extensão a 72°C por 1 min. Uma etapa final de extensão foi realizada a 72°C por 5 min.

Para a detecção do gene *mecA* utilizou-se um volume total de 50µL para a reação composta de 5 µL de DNA liberado por lise térmica, 200 µM de cada desoxinucleotídeo trifosfatado (dATP, dGTP, dCTP e dTTP), 50 µmoles dos iniciadores MRS<sub>1</sub> (5'TAGAAATGACTGAACGTCCG<sup>3'</sup>) e MRS<sub>2</sub> (5'TTGCGATCAATGTTACCTAG<sup>3'</sup>) para detecção de um fragmento de 154 pb do gene *mecA*, 1,0 U de *Taq* DNA polimerase (Promega, Madison, WI, EUA), 10 µL do tampão da enzima 5x (10 mM Tris HCl, 25mM KCl) e 2 mM de MgCl<sub>2</sub>. Após realização de uma etapa de desnaturação inicial de 94°C por 3 min, foram realizados 30 ciclos de amplificação: desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento a 55°C por 1min e extensão a 72°C por 2 min, seguido de uma etapa final de extensão, realizada a 72°C por 5 min (SANTOS *et al.* 1999)

As amostras controle utilizadas foram *S. aureus* ATCC 33591 (*mecA* positiva) e 633a (*seh* positiva – amplicon de 336 pb sequenciado neste estudo).

Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,0% em TBE (0,89 M Tris [Sigma], 0,89 M ácido bórico [Madison, WI, EUA], 2,5 mM EDTA [Sigma], pH 8,2), a 80 V por 1:30 h. O gel, previamente adicionado de 1 µL/mL de solução de GelRead® foi analisado sob luz ultravioleta. Como padrão de DNA para a corrida eletroforética foi utilizado 100 pb DNA ladder (Biotools).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A sociedade atual tem dado cada vez mais importância à alimentação, como forma de prevenção de doenças e fonte de energia saudável. Não se deve esquecer, no entanto, a higiene na manipulação dos alimentos, o que torna imprescindível a aplicação de Boas Práticas, através da avaliação e orientação das pessoas quanto às principais medidas de higiene a serem aplicadas. As condições do ambiente de trabalho, as características de utensílios e equipamentos, e as condições técnicas do material de limpeza têm grande importância na higiene e na manipulação de alimentos, mas nada suplanta importância das técnicas de manipulação e a própria saúde dos manipuladores de alimento na epidemiologia das DTA's (BRASIL *et al.*, 2013).

O pré – requisito da intoxicação alimentar estafilocócica é que o alimento ou um dos seus componentes esteja contaminado com uma estirpe enterotoxigênica de *Staphylococcus spp.* Além disso, cinco condições são necessárias para induzir a intoxicação alimentar estafilocócica: uma fonte contendo *Staphylococcus* produtor de enterotoxina: portador saudável ou infectado; transferência deste da fonte para o alimento; alimentos que apresentam em sua composição características físico-químicas para o crescimento de *Staphylococcus aureus.*; temperatura favorável e tempo suficiente para o crescimento bacteriano e produção de toxinas; ingestão de alimentos contendo quantidades suficientes de toxinas para provocar a sintomatologia. Mas, a intoxicação alimentar pode ocorrer devido a prática de higiene precária durante o processamento, cocção e distribuição dos produtos prontos. Contudo, depois da contaminação, o resfriamento inadequado do alimento pode induzir ao crescimento de *Staphylococcus* ou estimular a produção de toxinas, resultando na intoxicação alimentar (HENNEKINNE *et al.*, 2011).

Das cinquenta amostras analisadas, vinte e uma eram isoladas de alimentos, e dezenove (90%) foram positivas para presença de *Staphylococcus sp.* Vinte e nove amostras foram isoladas de utensílios ou superfície e semeadas em Agar Manitol Salgado, onde vinte e seis amostras (89%) foram positivas, sendo 3 destas fermentadoras de manitol. Das quarenta e cinco amostras positivas para presença de *Staphylococcus sp.*, duas eram catalase-negativas (identificadas pela técnica de MALDI-TOF MS como *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis*). Quatro amostras foram identificadas apenas a nível de gênero, com score de 1,7 a 1,99, enquanto que as 39 amostras restantes de cocos gram-positivos catalase-positivos foram identificadas a nível de espécie, com score maior que 2,0. Destas 39 amostras, duas não eram pertencentes ao gênero *Staphylococcus*, sendo identificadas como *Macrococcus caseolyticus* e *Kocuria kristinae*. Para confirmação destes resultados, foi realizado o teste de Resistência a Bacitracina para confirmação do gênero *Kocuria*, e teste da oxidase para caracterização do gênero *Macrococcus* (BANNERMAN & PEACOCK, 2007). A amostra identificada como *Kocuria kristinae* apresentou sensibilidade a Bacitracina, diferente do gênero *Staphylococcus*, que é resistente a este antimicrobiano, enquanto a amostra identificada como *Macrococcus caseolyticus* era produtora da enzima oxidase, o que não se observa no gênero *Staphylococcus*.

Das 41 amostras de *Staphylococcus* analisadas, 16 (39%) foram identificadas como *S. saprophyticus*, 14 (34%) como *S. sciuri*, 3 (7%) como *S. vitulinus*, 2 (5%) como *S. xylosus*, 1 (2%) como *S. carnosus*, 1 (2%) como *S. aureus* e 4 (11%) como *Staphylococcus sp.* Apesar de não ser associado frequentemente a amostras de alimentos, percebe-se a alta incidência de *S. saprophyticus*, um SCN associado a infecções urinárias comunitária, o que remete a contaminação proveniente de manipuladores, bem como *S. sciuri*, proveniente

de microbiota de animais domésticos (BANNERMAN & PEACOCK, 2007; BARGHAVA & ZHANG, 2014)

Paim e Colaboradores (2013) demonstraram que a metodologia de identificação de micro-organismos utilizando MALDI-TOF MS produziu uma identificação concordante em 440 (97,8%) dos 450 isolados de cocos gram-positivos identificados pelo método fenotípico convencional. A identificação das espécies pela técnica de MALDI-TOF MS demonstrou ser acurada e rápida. Das 45 amostras, apenas 4 (9%) foram identificadas apenas a nível de gênero. A técnica identifica os micro-organismos em um tempo muito curto (< 10 min.), com um mínimo de preparação das amostras e que apresenta baixo custo em termos de reagentes. Uma identificação bioquímica convencional oneraria 48 a 72 horas para ser realizada, ou utilizaria kits de identificação comerciais que tem custo elevado. (SANTOS *et al.*, 2013) Além disso, é uma técnica que apresenta alta precisão a nível de espécies e, que neste estudo apresentou 90% de precisão para identificação das espécies com confiabilidade para confirmação do gênero *Staphylococcus*.

Das quarenta e uma amostras de *Staphylococcus sp*, uma (2,4%) era SCP (identificado como *S. aureus* por MALDI-TOF MS) e 40 (97,6%) amostras de SCN. A amostra de *S. aureus* encontrada fora isolada de amostra de alimento (amostra A17, isolada de asa de frango), e não foram detectados nesta amostra os genes *seh* e *mecA*. No entanto, não foram encontradas amostras positivas de SCP isoladas de superfícies e utensílios, enquanto Silva (2006) obteve altas contagens de SCP em estudo de avaliação da qualidade microbiológica de utensílios e superfícies de manipulação de alimentos de unidade de alimentação. O grande percentual de amostras positivas de *Staphylococcus spp.* em superfícies de preparo de alimentos demonstra a importância desses locais como fontes potenciais de disseminação de micro-organismos, principalmente através da contaminação cruzada de alimentos. Cabe ressaltar, que a contaminação cruzada tem sido frequentemente relatada como fator responsável pela ocorrência de enfermidades de origem alimentar (SILVA JÚNIOR, 2002). No entanto, percebe-se que cada vez mais os SCN vêm sendo descritos associados a amostras relacionadas a alimentos. Em um estudo recente de Santos (2009), de um total de 60 amostras isoladas de superfície em uma indústria de laticínios, 41 pertenciam ao gênero *Staphylococcus*, sendo 16 (39,0%) destas SCP e 25 (61,0%) SCN, mostrando que tais achados são preocupantes principalmente se considerada a capacidade enterotoxigênica de algumas estirpes de estafilococos coagulase-positivo e estafilococos coagulase-negativo, fato este que pode significar a ocorrência de riscos para a saúde pública. Em nosso estudo, observou-se também uma taxa elevada de isolamento de SCN.



Quando realizado a técnica de PCR para a detecção do gene *mecA* nas 41 estirpes obtidas de *Staphylococcus sp*, 6 amostras de alimentos e 7 amostras de superfícies foram positivas para o gene (Tabela 2). As espécies portadoras dos gene estão relacionadas na Tabela 3. Encontramos neste estudo amostras de *S. saprophyticus*, *S. sciuri* e *S. saprophyticus* portadores do gene *mecA*. Amostras destes SCN multirresistentes já vêm sendo descrito na literatura (BARGHAVA & ZHANG, 2014; KUREKCI, 2016; JEONG *et al.*, 2016). Para confirmação da expressão do gene *mecA*, que codifica resistência a oxacilina e outros antimicrobianos, as amostras foram submetidas a triagem em ágar contendo 4 µg/mL de oxacilina, conforme Ferreira e colaboradores (2004). Todas as amostras cresceram confluentemente, mostrando que todas expressavam o gene (dados não mostrados). O gene *mecA* encontra-se altamente conservado entre as espécies de *Staphylococcus* e sua origem ainda não está definida, porém alguns estudos demonstram que há similaridade entre as seqüências de aminoácidos das PBPs de *S. sciuri* e de *S.aureus* o que sugere que o gene *mecA* pode ter se originado a partir de *Staphylococcus* coagulase-negativos (WU *et al.*, 1996).

Os SCN apresentaram um percentual expressivo (32%) para positividade do gene *mecA*, principalmente nas amostras de superfícies e, este tipo de gene pode ser transferido entre espécies do gênero *Staphylococcus*, e pode favorecer a contaminação cruzada entre superfície x manipulador x alimento, o que poderá favorecer a contaminação alimentar e a possibilidade de ocorrência de DTA's.

O gene *seh* fora detectado em uma amostra de SCN (*S. saprophyticus*) isolada de fatiadora de frios (Tabela 2; Figura 1). Este resultado é importante pois a Legislação Brasileira não recomenda a pesquisa de SCN (apenas a detecção de coagulase), de forma que esta amostra toxigênica não seria detectada se apenas os parâmetros atuais fossem utilizados. Para fins de confirmação, os amplicons de 336 pb encontrados na amostra controle (633a) e da amostra isolada no presente estudo foram seqüenciadas e confirmadas como pertencentes a um fragmento do referido gene (dados não mostrados). Durante muito tempo, o *S. aureus* foi considerado como a única espécie patogénica entre as espécies de *Staphylococcus*, enquanto que os SCN eram classificados como agentes contaminantes. No entanto, atualmente, as técnicas de biologia molecular têm mostrado que estes microrganismos também possuem genes que codificam enterotoxinas e outros fatores de virulência (RALL *et al.*, 2010). Borges e colaboradores (2008) recomendaram que a presença de espécies de SCN não sejam ignoradas em investigações de casos suspeitos de intoxicação estafilocócica, uma vez que este grupo de patógenos, estando presente no alimento, oferece risco de causar intoxicação ao consumidor.

A produção de coagulase é uma característica utilizada na identificação de *S. aureus* (SILVA e SILVA, 2005). A legislação brasileira, através da Resolução RDC nº12 (BRASIL, 2001), indica a pesquisa de estafilococos coagulase positiva como indicativo de *S. aureus*. Apesar da legislação brasileira não exigir a pesquisa da presença de (SCN), estudos mostram que estes são produtores de enterotoxinas assim como os SCP, em especial *S. aureus*. (FREITAS *et al.*, 2009) associado com surtos de doenças transmitidas por alimentos (VERAS *et al.*, 2008). No presente estudo, apenas uma amostra apresentava enterotoxina H e esta era SCN. Devido a esse fato, os mesmos têm recebido mais atenção pelos governos e indústrias ao estabelecer normas, métodos ou especificações microbiológicas (ZELL *et al.*, 2008). Sendo assim, sugere-se que a Legislação Brasileira inclua a pesquisa de SCN como uma nova categoria de avaliação (BRASIL, 2001).

Conclui-se que, de acordo com os resultados encontrados no presente estudo, nota-se um alto percentual de contaminação dos produtos alimentícios e principalmente das superfícies que entram em contato direto com os alimentos. Sendo assim, sugere-se uma deficiência no do ponto de vista higiênico – sanitário, sendo necessárias a implementação de técnicas que possam diminuir ou sanar a ocorrência da multiplicação bacteriana nos alimentos e superfícies. O número expressivo de estirpes SCN reforça o crescimento dos mesmos em casos de contaminação alimentar e é sugestivo para que a Legislação Brasileira inclua a pesquisa de SCN como uma nova categoria de avaliação.



CLIVER, D.O. **Foodborne disease handbook: diseases caused by bacteria**. New York: Marcel Dekker. 613p., 1994.

Ferreira RB, Iorio NL, Malvar KL, Nunes AP, Fonseca LS, Bastos CC, Santos KR. *J Clin Microbiol*.41(8):3609-14,2003. Erratum in: *J Clin Microbiol*. 42(8):3913, 2004.

GERMANO, M. I. S. *et al*. **Manipuladores de alimentos: capacitar? É preciso. Regulamentar? Será preciso?** *Hig. Alim.*, v.4,p.18-22,2000.

HENNEKINNE, J.A.; OSTYN, A.; GUILLIER, F. **How should Staphylococcal Food Poisoning Outbreaks Be Characterized?** *Toxins*, 2,2106-2116, 2011. Disponível em: <http://www.mdpi.com/2072-6651/2/8/2106>. Acesso em: 07 set. de 2016.

HUSSEIN, NR; BASHARAT, Z.; MUHAMMED, AH; AL- DABBAGH, SA. “ **Avaliação comparativa de MRSA nasal. Colonização Epidemiologia na Comunidade Escola Secundária Urbana e Rural do Curdistão, Iraque.**” *PLOS ONE*. 10(5), 2015.

ITO, T., HIRAMATSU, K. **A aquisição de resistência à meticilina e progressão da resistência multi antibiótico resistente à meticilina *Staphylococcus aureus***. *Yonsei Med. J.*39: 526- 533, 1998.

IWG-SCC.**International Working Group on the Staphylococcal Cassette Chromosome elements**. Endereço eletrônico: [http://www.sccmec.org/Pages/SCC\\_HomeEN.html](http://www.sccmec.org/Pages/SCC_HomeEN.html); acesso em: 07set. 2016

JEONG, DW. ; LEE, B .; HER,JY.; LEE,KG.; LEE, JH. **Safety and technological characterization of coagulase-negative staphylococci isolates from traditional Korean fermented soybean foods for starter development**. *J Dairy Sci.*; 99(4):2680 - 8, 2016.

KÜREKCI, C. **Short communication: Prevalence, antimicrobial resistance, and resistant traits of coagulase-negative staphylococci isolated from cheese samples in Turkey**. *J Dairy Sci.*; 99(4):2675-9, 2016.

LOIR, Y.L.; BARON, F. *Research*, v.2,n.1,p.63-76, 2003.

LOWY, FD. “ **A resistência aos antimicrobianos: o exemplo de *Staphylococcus aureus***.” *J. Clin. Invest.* 111 (9): 1265-1273,2003.

MAISTRO, L.C.; HIRAYAMA.K. B.;MARTINELLI, R. M. **Controle de qualidade higiênico – sanitária no processo de produção de alimentos através da detecção de *Staphylococcus aureus* em mão de manipuladores.** Rev. Nutr. Pauta, v.75,p.38-42, 2005.

PAIM, T.; REITER, K.; OLIVEIRA, C.; AZEVEDO, P. **Desempenho da metodologia MALDI-TOF MS na identificação de cocos gram- positivos na cidade de Porto Alegre/RS, Brasil.** Journal of infection control. 2(2): 112-116, 2013.

PEREIRA, ELIEZER M.; SCHUENCK, RICARDO P.; MALVAR, KAROLINE L.; IORIO, NATALIA L.P.; MATOS, PRICILLA D.M.; OLENDZKI, ANDRÉ N.; OELEMANN, WALTER M.R.; DOS SANTOS, KÁTIA R.N.. ***Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus haemolyticus*: Methicillin-resistant isolates are detected directly in blood cultures by multiplex PCR.** Microbiological Research, v. 165, p. 243-249, 2010.

RALL V.L.M<sup>1</sup>., SFORCIN J.M., DEUS M. F. R.,SOUSA D. C., CAMARGO C. H., GODINHO N. C., GALINDO L. A., SOARES T. C. S., ARAÚJO JR. J. P. **Polymerase Chain Reaction Detection of Enterotoxins Genes in Coagulase-Negative Staphylococci Isolated from Brazilian Minas Cheese.** Foodborne pathogens and disease.v.7, n. 9, 2010.

SÁNCHEZ, G. N.; RODRIGUES, R.M.; OLVERA, P.R.; GARZA, L. M. **Development of two Multiplex Polymerase chain reaction for the detection of enterotoxigenic strains of *Staphylococcus aureus* isolated from foods.** Journal of Food Protection. v.66, n.6, p.1055-1062, 2002.

SANTOS, A. *et al.* **Avaliação da técnica de MALDI-TOF MS no laboratório de Microbiologia.** J. Bras. Patol. Med. Lab. 49(3):191-197, 2013.

SANTOS, K.R.N.; TEIXEIRA, L.M.; LEAL, G.S.; FONSECA, L.S.; & GONTIJO-FILHO, P.P. **DNA typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: isolates and factors associated with nosocomial acquisition in two Brazilian university hospitals.** J. Med. Microbiol. 48: 17-23, 1999.

SANTOS, S. **Investigação da presença e da formação de biofilmes por Estafilococos em micro-usina de beneficiamento de leite.** Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Faculdade de Ciência Agrárias e Veterinárias, 2009.

SATO’O, Y.; HISATSUNE, J.; NAGASAKO, Y.; ONO, H.K.; OMOE, K.; SUGAI, M. **Positive Regulation of Staphylococcal Enterotoxin H by Rot (Repressor of Toxin) Protein and Its importance in clonal complex 81 subtype 1 Lineage – Related food poisoning.** *Journals Applied and Environmental Microbiology*. 22: 7782-7790, 2015.

SILA J., SAUER P. , KOLAR M. **Comparison of the prevalence of genes coding for enterotoxins, exfoliatins, panton-valentine leukocidin and tsst-1 between methicillin-resistant and methicillin-susceptible isolates of *Staphylococcus aureus* at the University Hospital in Olomouc.** *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc. Czech Repub. Sep*, 153(3):215–218.2009.

SILVA ER, SILVA N. **Coagulase gene typing of *Staphylococcus aureus* isolated from cows with mastitis in southeastern. Brazil.** *The Canadian Journal of Veterinary Research*; 69;260-264. 2005.

SILVA, L. F. **Procedimento operacional padronizado de higienização como requisito para segurança alimentar em unidade de alimentação.** Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, 2006

TRABULSI, L.R. ***Staphylococcus aureus*.** *Microbiologia*. 4 ed. São Paulo: Editora Atheneu. p.175-182, 2002.

VERAS JF, DO CARMO LS, TONG LC, *et al*. **A study of the enterotoxigenicity of coagulase-negative and coagulase-positiv staphylococcal isolates from food poisoning outbreaks in Minas Gerais, Brazil.** *Int J Infect Dis*;12:410– 415. 2008.

WU, S.; PISCITELLI, C.; DE LENCASTRE, H. **Tracking the evolutionary origin of the methicillin resistance gene: cloning and sequencing of a homologue of *mecA* from a methicillin susceptible strain of *Staphylococcus sciuri*.** *Microb Drug Resist*, 2: 435-441, 1996.

ZELL C, RESCH M, ROSENSTEIN R, *et al.* **Characterization of toxin production of coagulase-negative staphylococci isolated from food and starter cultures.** *Int J Food Microbiol*, 2008;127: 246–251.

## APÊNDICE

Tabela 1 – Amostras de Alimentos selecionadas para o estudo

Siglas	Identificação
A1a	Presunto
A2	Queijo minas padrão
A3	Mortadela
A3a	Mortadela defumada
A4	Lombo suíno
A5	Pernil suíno
A6	Carré
A7	Carne moída
A8	Bife de alcatra
A9	Bacon
A11	Queijo minas padrão
A12a	Peito de frango defumado
A13a	Bife patinho in natura
A13b	Bife patinho
A17a	Asa de frango
A18	Fígado bovino
A18a	Fígado de galinha
A21	Carne seca traseira
A21a	Carne seca dianteira
A23	Carne não manipulada
A24	Queijo mussarela



**Tabela 2 – Amostras de superfícies e utensílios selecionadas para o estudo**

Siglas	Identificação
S1	Ambiente
S3a	Serrafita
S4	Moedor de carne (saída)
S6	Cortador de pizza
S7	Tesoura
S10a	Suporte q. minas frescal
S13a	Faca de açougue
S15a	Monta carga
S17a	Mesa de manipulação (salgados)
S20a	Caixa plástica de queijo mussarela
S24a	Mesa de manipulação (padaria)
S26	Faca de desossa
S29a	Balcão laticínios 1
S29b	Balcão laticínios 2
S29c	Balcão laticínios 3
S32	Fatiadora de frios
S33	Mesa de preparo de massa de pizza
S33a	Tabuleiro pizza
S34	Caixa branca (queijo mussarela)
S34a	Caixa branca (queijo prato)
S34b	Caixa branca (presunto)
S35a	Balcão de corte carne
S35b	Balcão de corte aves
S36a	Mesa de corte
S37	Faca de açougue
S38	Caixa de açougue 1
S39	Avental de açougue 1
S40	Caixa de açougue 2
S45	Mesa de apoio (padaria)

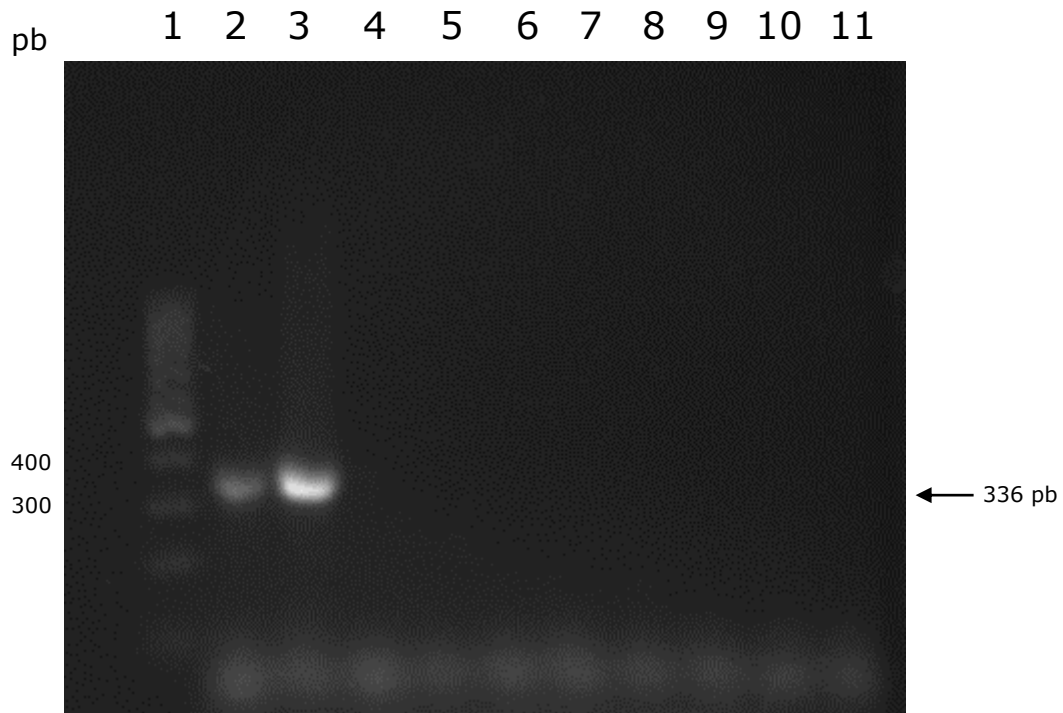
**Tabela 3: Características referentes as 41 estirpes obtidas de *Staphylococcus sp.* encontradas no presente estudo.**

Amostras	Origem	PCR <i>mecA</i>	PCR <i>seh</i>
SCP (1)	Alimento (1)	Positivo (0)	Positivo (0)
	Superfície/ Utensílio (0)	Negativo (1)	Negativo (1)
		Positivo (0)	Positivo (0)
		Negativo (0)	Negativo (0)
SCN (40)	Alimento (13)	Positivo (6)	Positivo (0)
	Superfície/ Utensílio (27)	Negativo (7)	Negativo (13)
		Positivo (7)	Positivo (1)*
		Negativo (20)	Negativo (26)

\*Amostra isolada de fatiadora de frios.

**Tabela 4: Espécies de *Staphylococcus* portadores do gene *mecA* isolados**

Amostras	Espécie
Alimentos (6)	<i>Staphylococcus sp.</i> (2)
	<i>S.saprophyticus</i> (2)
	<i>S. vitulinus</i> (1)
	<i>S. xylosus</i> (1)
Superfícies (7)	<i>Staphylococcus sp.</i> (2)
	<i>S.saprophyticus</i> (3)
	<i>S. vitulinus</i> (1)
	<i>S. sciuri</i> (1)



**Figura 1** – Eletroforese em gel de agarose evidenciando um segmento de 336 pb do gene *seh* em amostras de *Staphylococcus* submetidas a PCR: Linha 1 – padrão de tamanho de DNA em pares de bases (100pb ladder); Linha 2: controle positivo (*S. aureus* produtor de *seh*); Linha 3 – amostra de SCN isolado de *swab* de fatiadora de frios, um *S. saprophyticus* portador do gene *seh*; Linhas 4 a 10 – amostras isoladas de alimentos não-portadoras do gene *seh*; Linha 11 – controle negativo (*S. aureus* ATCC 25923, não portador de *seh*).

## 5 CONCLUSÃO GERAL DO TRABALHO

- As estirpes *Staphylococcus* coagulase – negativas representaram 98 % das analisadas, sendo 33% em amostras de alimentos e 67% em amostras de superfícies e utensílios, demonstrando a necessidade de uma maior preocupação na pesquisa de SCN em alimentos, superfícies e utensílios;
- A identificação do gene *mecA* ocorreu em 13 estirpes não-produtoras da enzima coagulase, sendo 6 de alimentos e 7 de superfície, demonstrando que os SCN podem estar presentes em amostras de alimentos, e carrear genes associados a resistência a antimicrobianos;
- A presença da enterotoxina *seh* em uma amostra de superfície mostrou que os SCN podem ser carreadores de genes codificadores de enterotoxinas. Devido a esse fato, os mesmos têm recebido mais atenção pelos governos e indústrias ao estabelecer normas, métodos ou especificações microbiológicas;
- O presente estudo mostra a necessidade de intensificar os procedimentos de Boas Práticas, visando o treinamento adequado e constante dos manipuladores de alimentos, no intuito de melhorar a sua percepção acerca dos cuidados com os alimentos e de todos os utensílios envolvidos nos preparos dos alimentos.



BRASIL, **Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 12 de 02 de janeiro de 2001.** Aprova o Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial da União, Brasília.

BRASIL, **Instrução Normativa nº 62 que regulamenta os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água,** 2003.

BRASIL, Carla *et al.* **Conhecimentos de manipuladores de alimentos do setor supermercadista sobre higiene alimentar.** Revista de Ciência e Tecnologia, 20: 19-23, 2013.

CAVALCANTI, S.M.; FRANCA, E.R.; CABRAL,C.; VILELA, M.A.; MONTENEGRO, F.; MENEZES, D. &MEDEIROS, A.C.. **Prevalence of *Staphylococcus aureus* introduced into intensive care units of a University Hospital.**Braz. J. Infect. Dis.; 9:56-63, 2005.

CHRISTIANSON, S., G. R.;GOLDING, J.; CAMPBELL & MULVEY, M. R. **Comparative genomics of Canadian epidemic lineages of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.** J ClinMicrobiol, 45, 1904-1911, 2007

CLIVER, D.O. **Foodborne disease handbook: diseases caused by bacteria.** New York: Marcel Dekker.. 613p., 1994.

CONSELHO FEDERAL DE NUTRICIONISTAS. Resolução n. 380, de 2005. **Dispões sobre a definição das áreas de atuação do nutricionista e suas atribuições, estabelece parâmetros numéricos de referência, por área de atuação e dá outras providências.** Diário oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 10 janeiro 2006, p.66.

CROXATTO, A.,PROD'HOM, G., GREUB. G. **Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology.** FEMS Microbiol Rev. 36(2): p. 380-407, 2012.

CUNHA *et al.* **Significância clínica de estafilococos coagulase negativa isolados de recém nascidos.** Jornal de Pediatria. Vol. 78, n.4, 279-288 p., 2002.

CUNHA, M.L.R.S.; SINZATO, Y.K. & SILVEIRA, L.V.A. **Comparison of methods for the identification of coagulase-negative staphylococci.** Mem. Inst. Oswaldo Cruz 99:855-60, 2004.

FERREIRA RB, IORIO NL, MALVAR KL, NUNES AP, FONSECA LS, BASTOS CC, SANTOS KR. J Clin Microbiol.41(8):3609-14,2003. Erratum in: J Clin Microbiol. 42(8):3913, 2004.

FRANCO, B.D.G. de M; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**, 2 ed. São Paulo: Editora Atheneu. 184 p., 2005.

GARCIA, P.; BENITEZ, R.; LAM, M.; SALINAS, A.M.; WIRTH, H.; ESPINOZA, C.; GARAY, T.; DEPIX, M.S.; LABARCA, J. &GUZMAN, A.M. . **Coagulase-negative staphylococci: clinical, microbiological and molecular features to predict true bacteraemia.** J. Med. Microbiol. 53:67-72., 2004.

GERMANO, M. I. S. *et al.* **Manipuladores de alimentos: capacitar? É preciso. Regulamentar? Será preciso?** Hig. Alim., v.4,p.18-22,2000.

GOULART, Vânia; RESENDE, Rodrigo R. **MALDI – TOF: uma ferramenta revolucionária para as análises clínicas e pesquisa do câncer.** Nanocell News. V.1, N.3., 2013.

HENNEKINNE, J.A.; OSTYN, A.; GUILLIER, F. **How should Staphylococcal Food Poisoning Outbreaks Be Characterized?** Toxins, 2,2106-2116, 2011. Disponível em: <http://www.mdpi.com/2072-6651/2/8/2106>. Acesso em: 07 set. de 2016.

HIRAMATSU, K.; CUI, L.; KURODA, M. & ITO, T. **The emergence and evolution of methicilin-resistant *Staphylococcus aureus*.** Trends Microbiol. 9: 486-493, 2001.

HUEBNER, J. & GOLDMANN, D. A. **Coagulase-negative staphylococci: role as pathogens.** Annu. Rev. Med.50:223–236, 1999.

HUSSEIN, NR; BASHARAT, Z.; MUHAMMED, AH; AL- DABBAGH, SA. “ **Avaliação comparativa de MRSA nasal. Colonização Epidemiologia na Comunidade Escola Secundária Urbana e Rural do Curdistão, Iraque.**” PLOS ONE. 10(5);. 2015.



ING, H.B.; BADDOUR, L.M. & BAYER, A.S. **Bacteremia and infective endocarditis: pathogenesis, diagnosis, and complications.** In: The Staphylococci in Human Disease, Crossley, K.B. & Archer, G.L. (eds), Churchill Livingstone, New York, USA. p.331-355., 1997.

ITO, T., HIRAMATSU, K. **A aquisição de resistência à meticilina e progressão da resistência multi antibiótico resistente à meticilina *Staphylococcus aureus*.** Yonsei Med. J.39: 526- 533, 1998.

ITO, T.; MA, X.X.; TAKEUCHI, F.; OKUMA, K.; YUZAWA, H. & HIRAMATSU, K. **Novel type V staphylococcal cassette chromosome *mec* driven by a novel cassette chromosome recombinase, *ccr*.** Antimicrob Agents Chemother, 48(7), 2637-2651, 2004

IWG-SCC.**International Working Group on the Staphylococcal Cassette Chromosome elements.** Endereço eletrônico: [http://www.sccmec.org/Pages/SCC\\_HomeEN.html](http://www.sccmec.org/Pages/SCC_HomeEN.html); acesso em: 07 set. 2016.

JARLOV, J.O. **Phenotypic characteristics of coagulase-negative staphylococci: typing and antibiotic susceptibility.** APMIS. 107: 1S-42S., 1999.

JEONG, DW. ; LEE, B. ; HER, JY.; LEE, KG.; LEE, JH. **Safety and technological characterization of coagulase-negative staphylococci isolates from traditional Korean fermented soybean foods for starter development.** J Dairy Sci.; 99(4):2680 - 8, 2016.

KOCHANSKI, S.; PIEROZAN, M.K.; MOSSI, A.J. **Avaliação das condições microbiológicas de uma unidade de alimentação e nutrição.** Alim Nutri, v.20, n.4, p.663-668, out-dez, 2009. Disponível em: <http://200.145.71.150/seer/index.php/alimentos/article/viewFile/1264/873>. Acesso em: 10 set. de 2016.

KÜREKCI, C. **Short communication: Prevalence, antimicrobial resistance, and resistant traits of coagulase-negative staphylococci isolated from cheese samples in Turkey.** J Dairy Sci.; 99(4):2675-9, 2016.

LAMBE, D.W.; FERGUSON, K.P. JR.; KEPLINGER, K.L.; GEMMEL, C.G. & KALBFLEISCH, J.H. **Pathogenicity of *Staphylococcus lugdunensis*, *Staphylococcus***

***schleiferi* and three others coagulase-negative staphylococci in a mouse model and possible virulence factors.** Can. J. Microbiol. 36: 455-463,1990.

LI, S.; SKOV, R.L.; HAN, X.; LARSEN, A.R.; LARSEN, J.; SORUM, M.; WULF, M.; VOSS, A.; HIRAMATSU, K & ITO, T. **Novel types of staphylococcal cassette chromosome *mec* elements identified in clonal complex 398 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains.** Antimicrob Agents Chemother, 55(6), 3046-3050, 2011

LOIR, Y.L.; BARON, F. Research, v.2,n.1,p.63-76, 2003.

LOWY, FD. “ **A resistência aos antimicrobianos: o exemplo de *Staphylococcus aureus*.**” J. Clin. Invest. 111 (9): 1265-1273, 2003.

LPSN, **List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature – Genus *Staphylococcus***, 2016. Disponível em: <http://www.bacterio.net/staphylococcus.html>; acesso em: 07 set. 2016

MAISTRO, L.C.; HIRAYAMA.K. B.;MARTINELLI, R. M. **Controle de qualidade higiênico – sanitária no processo de produção de alimentos através da detecção de *Staphylococcus aureus* em mão de manipuladores.**Rev. Nutr. Pauta, v.75,p.38-42, 2005.

NAJERA-SANCHES, G.; MALDONADO-RODRIGUEZ,R.; OLVERA, P.R.; GARZA, L.M. **Development of two multiplex polymerase chain reactions for the detection of enterotoxigenic strains of *Staphylococcus aureus* isolated from foods.** Journal of Food Protection, v.66,n.6,p.1055-1062,2003.

OLIVEIRA, D.C..; MILHEIRIÇO, C; DE LENCASTRE, H. **Redefining a structural variant of a *staphylococcal* cassette chromosome *mec*, SCC*mec* type VI.** Antimicrob Agents Chemother, 50(10), 3457-3459, 2006

OTTO, M. **Virulence factors of coagulase-negative staphylococci.** Front. Biosci.9:841-863, 2004.

PAIM, T.; REITER, K.; OLIVEIRA, C.; AZEVEDO, P. **Desempenho da metodologia MALDI-TOF MS na identificação de cocos gram- positivos na cidade de Porto Alegre/RS, Brasil.** Journal of infection control. 2(2): 112-116, 2013.

PASTERNAK, Jacyr. **Novas metodologias de identificação de micro-organismos: MALDI – TOF**. Einstein; 10 (1): 118-9. 2012.

PEREIRA, ELIEZER M.; SCHUENCK, RICARDO P.; MALVAR, KAROLINE L.; IORIO, NATALIA L.P.; MATOS, PRICILLA D.M.; OLENDZKI, ANDRÉ N.; OELEMANN, WALTER M.R.; DOS SANTOS, KÁTIA R.N.. ***Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus haemolyticus*: Methicillin-resistant isolates are detected directly in blood cultures by multiplex PCR**. Microbiological Research, v. 165, p. 243-249, 2010.

PEREIRA, Karen Signori; PEREIRA, José Luiz. **Estafilococos coagulase negativa: potenciais patógenos em alimentos**. Higiene Alimentar, v19, n129, p.32-34, 2005.

PEREIRA, M.A.; PEREIRA, J.L.; SERRANO, A.M.; BERGDOLL, M.S. **Estafilococos: Até onde sua importância em Alimentos?** Higiene Alimentar, v.14,n.68,p.32-39,2002.

PEREIRA, M.L. et al.. **Enumeração de Coliformes Fecais e Presença de *Salmonellas* spp. em Queijo Minas**. Revista Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v.15,n5,2000.

PROJAN, S.J. & NOVICK, R.P. **The molecular basis of pathogenicity**. In: The Staphylococcus in human disease. Crossley, K.B & Archer, G.L. (ed). Churchill Livingstone, New York, USA, p.55-81,1997.

RALL V.L.M., SFORCIN J.M., DEUS M. F. R., SOUSA D. C., CAMARGO C. H., GODINHO N. C., GALINDO L. A., SOARES T. C. S., ARAÚJO JR. J. P. **Polymerase Chain Reaction Detection of Enterotoxins Genes in Coagulase-Negative Staphylococci Isolated from Brazilian Minas Cheese**. Foodborne pathogens and disease.v.7, n. 9, 2010.

RUHE, J.; MENON, D.; MUSHATT, D.; DEJACE, P. & HASBUN, R. **Non-epidermidis coagulase-negative staphylococcal bacteremia: clinical predictors of true bacteremia**. Eur. J. Clin. Microbio. Infect. Dis.26:495-498, 2004.

SÁNCHEZ, G. N.; RODRIGUES, R.M.; OLVERA, P.R.; GARZA, L. M. **Development of two Multiplex Polymerase chain reaction for the detection of enterotoxigenic strains of *Staphylococcus aureus* isolated from foods**. Journal of Food Protection. v.66, n.6, p.1055-1062, 2002.

SANTOS, A. *et al.* **Avaliação da técnica de MALDI-TOF MS no laboratório de Microbiologia.** J. Bras. Patol. Med. Lab. 49(3):191-197, 2013.

SANTOS – FILHO, L. **Manual de Microbiologia Clínica.** 3. Ed. João Pessoa: Ed. Universitária, 2003.

SANTOS, K.R.N.; TEIXEIRA, L.M.; LEAL, G.S.; FONSECA, L.S.; & GONTIJO-FILHO, P.P. **DNA typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: isolates and factors associated with nosocomial acquisition in two Brazilian university hospitals.** J. Med. Microbiol. 48: 17-23, 1999.

SANTOS, S. **Investigação da presença e da formação de biofilmes por Estafilococos em micro-usina de beneficiamento de leite.** Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Faculdade de Ciência Agrárias e Veterinárias, 2009.

SATO’O, Y.; HISATSUNE, J.; NAGASAKO, Y.; ONO, H.K.; OMOE, K.; SUGAI, M. **Positive Regulation of Staphylococcal Enterotoxin H by Rot (Repressor of Toxin) Protein and Its importance in clonal complex 81 subtype 1 Lineage – Related food poisoning.** Journals Applied and Environmental Microbiology. 22: 7782-7790, 2015.

SHORE, A.C.; DEASY, E.C.; SLICKERS, P.; BRENNAN, G.; O’CONNEL, B.; MONECKE, S.; EHRICHT, P. & COLEMAN, D.C. **Detection of staphylococcal cassette chromosome *mec* type XI carrying highly divergent *mecA*, *mecI*, *mecR1*, *blaZ*, and *ccr* genes in human clinical isolates of clonal complex 130 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.** Antimicrob Agents Chemother, 55(8), 3765-3773, 2011.

SILA J., SAUER P. , KOLAR M. **Comparison of the prevalence of genes coding for enterotoxins, exfoliatins, panton-valentine leukocidin and *tsst-1* between methicillin-resistant and methicillin-susceptible isolates of *Staphylococcus aureus* at the University Hospital in Olomouc.** Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc. Czech Repub. Sep, 153(3):215–218.2009.

SILVA ER, SILVA N. **Coagulase gene typing of *Staphylococcus aureus* isolated from cows with mastitis in southeastern Brazil.** The Canadian Journal of Veterinary Research; 69;260-264. 2005.

SILVA Jr.,EA . Manual de Controle higiênico-sanitário em alimentos. 5ª. Edição. São Paulo: Varela; 2002.

SILVA, L. F. **Procedimento operacional padronizado de higienização como requisito para segurança alimentar em unidade de alimentação.** Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, 2006

SPANU, T.; SANGUINETTI, M.; CICCAGLIONE, D.; D'INZEO, T.; ROMANO, L.; LEONE, F. & FADDA, G. **Use of the VITEK 2 system for rapid identification of clinical isolates of staphylococci from bloodstream infections.** J. Clin. Microbiol.41:4259-4263, 2003.

TANG, Y.W.;PERSING, David. **Molecular detection and identification of microorganisms.** Manual of Clinical Microbiology. 7º edition. 462p., 1999.

TRABULSI, L.R. ***Staphylococcus aureus.*** *Microbiologia.* 4 ed. São Paulo: Editora Atheneu. p.175-182, 2002.

TRABULSI, L. R.; TEIXEIRA, L. M. & BUERIS, V. ***Staphylococcus aureus.*** In : *Microbiologia.* Trabulsi, L.R. & Alterthum, F. (eds) 4a edição. Ed. Atheneu, São Paulo, SP, Brasil. p: 175-182, 2004.

VERAS JF, DO CARMO LS, TONG LC, *et al.* **A study of the enterotoxigenicity of coagulase-negative and coagulase-positiv staphylococcal isolates from food poisoning outbreaks in Minas Gerais,.** Brazil. *Int J Infect Dis*;12:410– 415. 2008.

WONG, A.C.L & BERGDOLL, M.S. ***Staphylococcal Food Poisoning.*** *Foodborne Diseases.* 2ed. Elsevier, 2002.

WU, S.; PISCITELLI, C.; DE LENCASTRE, H. **Tracking the evolutionary origin of the methicillin resistance gene: cloning and sequencing of a homologue of *mecA* from a methicillin susceptible strain of *Staphylococcus sciuri.*** *Microb Drug Resist*, 2: 435-441, 1996.

[www.researchgate.net](http://www.researchgate.net). Consulta em: 17 set. 2016

ZELL C, RESCH M, ROSENSTEIN R, *et al.* **Characterization of toxin production of coagulase-negative staphylococci isolated from food and starter cultures.** *Int J Food Microbiol*, 2008;127: 246–251.