

## Comunicação

[Communication]

### Identificação de portadores de *Staphylococcus* enterotoxigênicos e avaliação da sensibilidade a antimicrobianos

[Identification of enterotoxigenic *Staphylococcus* carriers and antimicrobial susceptibility evaluation]

A.S. Bartels, A.D. Andrade, E. Neumann, A.M. Silva\*

Departamento de Ciências Biológicas, Ambientais e da Saúde - UNI-BH  
Belo Horizonte, MG

A intoxicação por *Staphylococcus* pode ser apontada como um dos tipos mais comuns de doença transmissível por alimento, na qual *Staphylococcus aureus* é a espécie mais frequente, pela presença de enterotoxinas pré-formadas em alimentos (Arcuri et al., 2006; Brant et al., 2007). Em diversos países, estabeleceu-se a obrigatoriedade de testes para detecção, como parte das ações de fiscalização sanitária de órgãos governamentais de saúde (Brasil, 2001). Entretanto, há relatos da detecção em alimentos, de linhagens de *Staphylococcus* coagulase negativo produtores de enterotoxinas. (Lamaita et al., 2005; Rapini et al., 2005; Veras et al., 2008).

A detecção e o controle de portadores de *S. aureus* é particularmente importante quando se trata de manipuladores de alimentos (Andrade e Zelante, 1989). O rastreamento epidemiológico de portadores de *S. aureus* tem buscado estabelecer a possível ligação entre o microrganismo na microbiota da pele e conjuntivas do homem e a propagação de linhagens resistentes no ambiente familiar ou de trabalho (Raddi et al., 1988; Rapini et al., 2005). O uso indiscriminado de antimicrobianos, com fins profiláticos ou terapêuticos ou, ainda, incorporados na alimentação, como “promotores de crescimento”, aumenta a pressão seletiva para linhagens multirresistentes (Müller, 2003). O gênero *Staphylococcus* é utilizado como indicador da qualidade de sanitização de estabelecimentos, principalmente quando

envolve intensa manipulação durante o processamento de alimentos (Freitas et al., 2004). Este estudo teve como objetivo identificar possíveis portadores de *Staphylococcus* enterotoxigênicos entre os alunos do curso de nutrição do Centro Universitário de Belo Horizonte - Uni-BH.

Após aprovação do projeto pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Centro Universitário de Belo Horizonte – Uni-BH, foram colhidas amostras de ambas as narinas e mãos de 173 indivíduos. As amostras foram semeadas em ágar Baird-Parker, ágar Hipertônico-Manita e no meio Tioglicolato<sup>1</sup>, seguindo-se incubação a 37°C por 48 horas. As colônias características de *Staphylococcus* foram transferidas para caldo BHI<sup>2</sup>, incubadas a 37°C por 24 horas. Os microrganismos isolados foram classificados segundo as características morfológicas, bioquímicas e cultivo (MacFaddin, 1980).

Para verificar a produção de enterotoxinas, foi utilizado o teste imunoenzimático, pelo método ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay) com o sistema automatizado, utilizando o kit VIDAS Staph enterotoxin II<sup>3</sup>. Depois de repicadas, as linhagens foram agrupadas de acordo com as características bioquímicas em *pools*, que foram inoculados em caldo BHI e incubados a 37°C por 48 horas, visando à produção de toxinas. Os *pools* foram mantidos sob refrigeração até a realização dos testes, quando foram centrifugados a 3000-5000 x g por 15min a 18–25°C. Em seguida, 500µL do sobrenadante

---

Recebido em 8 de julho de 2008

Aceito em 16 de novembro de 2009

\*Autor para correspondência (corresponding author)

E-mail: amsilva14@hotmail.com

---

<sup>1</sup>Oxoid – Basingstoke, Inglaterra.

<sup>2</sup>Biobras – Montes Claros, Brasil.

<sup>3</sup>BioMérieux – Marcy l’Etoile, França.

### Identificação de portadores...

foram depositados nas barretes do *kit*. A análise estatística foi realizada por meio de tabela de contingência, utilizando-se o programa Prima® versão 3, considerando significativos os valores de  $P < 0,05$ .

Para análise da sensibilidade aos antimicrobianos, utilizou-se o método de Kirby-Bauer (Bauer et al., 1966). Os antimicrobianos testados foram: azitromicina (15µg); cefalotina (30µg); cefoperazona (75µg); ceftriaxona (30µg); ciprofloxacina (5µg); eritromicina (15µg); imipenem (10µg); oxacilina (1µg) e tetraciclina (30µg). A interpretação dos resultados de sensibilidade foi feita de acordo com as especificações do National Committee for Clinical Laboratory Standards (Methods..., 2004).

O cultivo microbiano das amostras colhidas nas fossas nasais e nas mãos dos indivíduos analisados permitiu detectar 62 (35,8%) portadores de *S. aureus*, independentemente da área anatômica amostrada. Verificou-se a

presença do microrganismo concomitantemente nas mãos e nas fossas nasais em 15 (24,2%) indivíduos; somente nas mãos em 9 (14,5%) e somente no nariz em 38 (61,3%) (Fig. 1). Resultados semelhantes aos obtidos neste estudo foram encontrados por Andrade e Zelante (1989) ao verificarem 35,7% de indivíduos portadores, desses 10% apresentavam o microrganismo nas mãos e 45,0% no nariz. Números equivalentes também foram relatados por Raddi et al. (1988), Carvalho e Serafini (1996) e Rapini et al. (2005).

Constatou-se a produção de toxinas estafilocócicas em 71,4% dos *pools* de amostras coagulase positivo e em 7,1% dos *pools* coagulase negativo. Estes dados estão expressos na Fig. 2 e devem ser interpretados com cautela, já que a produção de enterotoxinas também ocorre em isolados que seriam considerados inócuos pela legislação vigente (Brasil, 2001). Lamaita et al. (2005), Rapini et al. (2005) e Veras et al. (2008) também encontraram estirpes de *Staphylococcus* coagulase negativo produtoras de toxinas em seus experimentos.

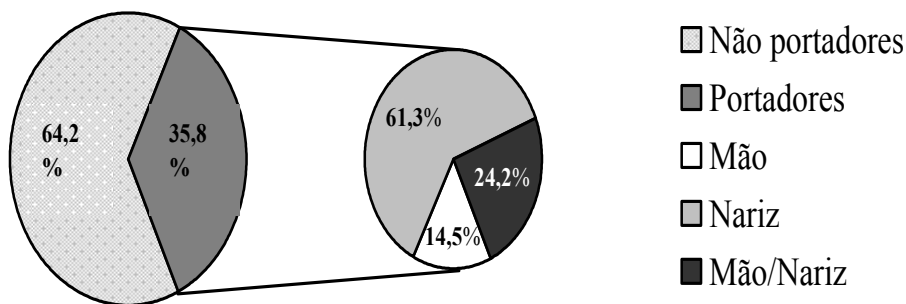


Figura 1. Portadores de *S. aureus*, de acordo com o sítio pesquisado, em 173 doadores analisados, Belo Horizonte, 2007.

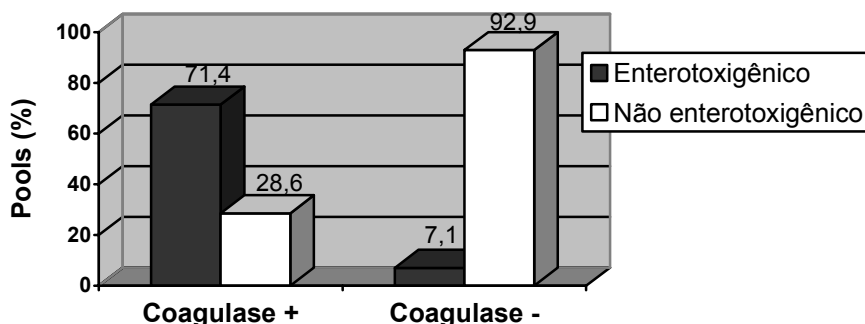


Figura 2. Produção de enterotoxina por *Staphylococcus* coagulase positivo e negativo, isolados de 62 dos 173 doadores analisados, Belo Horizonte, 2007.

Observou-se que houve associação entre a produção de coagulase pelas linhagens de *Staphylococcus* e enterotoxigenicidade (P=0,0013), estando de acordo com a prática da legislação em vigor.

A atividade da enzima coagulase tem sido usada para indicar patogenicidade de microrganismo toxigênico, e a enzima termonuclease sugerida como indicador mais confiável dessa enterotoxigenicidade (Bennett, 1996). Marques et al. (2006) utilizaram a produção de desoxirribonuclease (DNase) por linhagens de *Staphylococcus* coagulase positivo como indicador de patogenicidade. Após a análise estatística dos resultados obtidos neste estudo, não foi detectada associação entre a produção de enterotoxinas e de DNase (P=0,0852). Verificou-se associação entre produção de coagulase, DNase e enterotoxinas (P=0,0095), porém essa enterotoxigenicidade depende apenas da presença da coagulase.

Ainda assim, a simples detecção da produção de coagulase por procedimentos bioquímicos rotineiros não é suficiente e seguro para estabelecer enterotoxigenicidade e virulência de linhagens de *Staphylococcus*, uma vez que a bactéria pode possuir o gene e não expressá-lo em condições laboratoriais ou ser coagulase negativo e enterotoxigênica (Veras et al., 2008). Os resultados deste trabalho ratificam as recomendações de Lamaita et al. (2005) sobre a determinação de padrões para *Staphylococcus* spp. e não somente para *Staphylococcus* coagulase positivo conforme a legislação em vigor e/ou, ainda, preconizar a identificação de enterotoxinas nos diferentes alimentos, para garantir a real segurança desses.

Oliveira et al. (2000) e Müller (2003) relataram a ocorrência de linhagens de *Staphylococcus* apresentando resistência a antimicrobianos; já os

resultados desta pesquisa apontaram para alta e satisfatória taxa de sensibilidade à maioria dos antimicrobianos testados. Das linhagens isoladas, 38% apresentaram resistência à azitromicina, 36% à eritromicina, 14% à tetraciclina, 4% à cefalotina e 2% à ceftriaxona, enquanto os outros antimicrobianos (cefoperazona, ciprofloxacina, imipenem e oxacilina) foram 100% eficientes na eliminação dos microrganismos. A sensibilidade dos microrganismos à maioria dos antimicrobianos analisados é um bom resultado. No entanto, estes microrganismos podem adquirir resistência aos antimicrobianos pelo contato com outros microrganismos resistentes presentes na microbiota normal ou transitória dos indivíduos. Também não se deve excluir a preocupação com a possibilidade de multiresistência ocasionada pelo uso indevido de antimicrobianos.

Medidas para eliminar *S. aureus* são inviáveis, portanto a identificação de portadores, a capacitação dos manipuladores e a aplicação das boas práticas de fabricação são procedimentos relevantes para a prevenção da contaminação de alimentos, durante as diferentes fases de preparo, aí incluídas todas as medidas de higiene pessoal, utensílios e instalações. Dentro do grupo avaliado, a alta taxa de isolamento de *S. aureus*, seja das mãos, das narinas ou em ambas, é fator preocupante, pois o grupo analisado é candidato a trabalhar em unidades de alimentação dentro de alguns anos. O resultado para produção de toxinas, principalmente por *Staphylococcus* spp. que seriam considerados inócuos, requer maior atenção dos pesquisadores e dos órgãos de fiscalização sanitária, sugerindo revisão da legislação vigente.

Palavras-chave: *Staphylococcus*, enterotoxina, manipulador de alimentos, sensibilidade antimicrobiana

## ABSTRACT

*This study identified Staphylococcus aureus carriers among students of nutrition course, evaluating the capacity of producing staphylococcal enterotoxins (VIDAS Kit) and also the antimicrobial susceptibility (Kirby-Bauer method) of the isolates. Among 173 students sampled, 62 (35.8%) were detected as carriers of S. aureus, being 38 (61.3%) in nostrils; nine (14.5%) on the hands, and 15 (24.2%) in both sites. The production of staphylococcal toxins was detected in 71.4% of the positive-coagulase pools and in 7.1% of the negative-coagulase pools. Even though considerable resistance had been observed with azithromycin (38%), erythromycin (36%), and tetracycline (14%); cephalothin, cefoperazone, ceftriaxone, ciprofloxacin, imipenem, and oxacillin were effective to inhibit the microorganism growth. The high score*

### Identificação de portadores...

of healthy carriers was alarming; however, many of the isolated staphylococcus showed sensitive to most of the antimicrobial tested. The production of toxins was also relevant, mainly by strains that the current Brazilian legislation consider harmless.

Keywords: Staphylococcus, enterotoxin, food handler, antimicrobial susceptibility

### AGRADECIMENTOS

Ao Laboratório de Ecologia e Fisiologia de Microrganismos - ICB-UFMG, por ceder parte do material e equipamentos necessários à pesquisa. Ao Laboratório de Enterotoxinas - Fundação Ezequiel Dias (FUNED), pela realização das leituras dos kits de identificação de toxinas. À Professora Maura Vilela, pela análise estatística.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, G.P.; ZELANTE, F. Ocorrência simultânea de *Staphylococcus aureus* enterotoxigênicos nas mãos, boca e fezes em portadores assintomáticos. *Rev. Saúde Pública*, v.23, p.277-284, 1989.
- ARCURI, E.F.; BRITO, M.A.V.P.; PINTO, S.M. et al. Qualidade microbiológica do leite refrigerado nas fazendas. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.58, p.440-446, 2006.
- BAUER, A.W.; KIRBY, W.N.; SHERRIS, J.C. et al. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.*, v.45, p.493-496, 1966.
- BENNETT, R.W. Atypical toxigenic *Staphylococcus* and non-*Staphylococcus aureus* species on the horizon an update. *J. Food Protec.*, v.59, p.1123-1126, 1996.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução nº 12, de 02 de Janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, Seção 1, n.7-E, p.46-53.
- BRANT, L.M.F.; FONSECA, L.M.; SILVA, M.C.C. Avaliação da qualidade microbiológica do queijo-de-minas artesanal do Serro, MG. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.59, p.1570-1574, 2007.
- CARVALHO, C.O.; SERAFINI, A.B. Grupos de microrganismos isolados da orofaringe, nasofaringe e das mãos dos trabalhadores do restaurante da Universidade Federal de Goiás. *Hig. Alim.*, v.10, p.19-24, 1996.
- FREITAS, W.C.; SOUZA, E.L.; SOUSA, C.P. et al. Ocorrência de *Staphylococcus* em massa refrigerada tipo pizza pronta. *Hig. Alim.*, v.18, p.67-70, 2004.
- LAMAITA, H.C.; CERQUEIRA, M.M.O.P.; CARMO, L.S. et al. Contagem de *Staphylococcus* spp. e detecção de enterotoxinas estafilocócicas e toxina da síndrome do choque tóxico em amostras de leite cru refrigerado. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.57, p.702-709, 2005.
- MacFADDIN, J.F. *Pruebas bioquímicas para la indentification de bacterias de importância clinica*. Buenos Aires: Panamericana, 1980. 301p.
- MARQUES, M.R.H.; MARTINS, R.P.; CUNHA NETO, A. Ocorrência de *Staphylococcus coagulase* positivo em leite e queijo: identificação, perfil enzimático e biotipagem. *Hig. Alim.*, v.21, p.86-94, 2006.
- METHODS for bacteria that grow aerobically. 5.ed., Wayne, PA: NCCLS, 2004. (global inform. suppl., v.20).
- MÜLLER, F.M.P. *Susceptibilidade a antimicrobianos de Staphylococcus aureus recuperados de leite bovino in natura e envolvidos em surto de intoxicação alimentar*. 2003. 98f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- OLIVEIRA, G.A.; LEVY, C.A.; MAMIZUKA, E.M. *Staphylococcus aureus* apresentando resistência intermediária à vancomicina: mecanismo de resistência, detecção laboratorial e perspectivas de emergência no Brasil. *J. Bras. Patol.*, v.36, p.92-102, 2000.
- RADDI, M.S.G.; LEITE, C.Q.F.; MENDONÇA, C.P. *Staphylococcus aureus*: portadores entre manipuladores de alimentos. *Rev. Saúde Pública*, v.22, p.36-40, 1988.
- RAPINI, L.S.; CERQUEIRA, M.M.O.P.; CARMO, L.S. et al. Presença de *Staphylococcus* spp produtores de enterotoxinas e da toxina da síndrome do choque tóxico em manipuladores de queijo de cabra. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.57, p.825-829, 2005.
- VERAS, J.F.; CARMO, L.S.; TONG, L.C. et al. A study of the enterotoxigenicity of coagulase-negative and coagulase-positive staphylococcal isolates from food poisoning outbreaks in Minas Gerais Brazil. *Int. J. Infect. Dis.*, v.12, p.410-415, 2008.