

Presença de *Staphylococcus* spp. produtores de enterotoxinas e da toxina da síndrome do choque tóxico em manipuladores de queijo de cabra

[*Presence of Staphylococcus strains producer of enterotoxins and toxic shock toxin syndrome isolated from goat's cheese handlers*]

L.S. Rapini¹, M.M.O.P. Cerqueira^{2*}, L.S. Carmo³, J.F. Veras¹, M.R. Souza²

¹Médica Veterinária

²Escola de Veterinária - UFMG

Caixa Postal 567

30123-970 - Belo Horizonte, MG

³Fundação Ezequiel Dias - Belo Horizonte, MG

RESUMO

Agruparam-se 167 cepas de *Staphylococcus*, isoladas de diferentes sítios (fossas nasais, orofaringe, palma das mãos e leitos subungueais), de dois manipuladores de queijos de leite de cabra, em *pools* (45), de acordo com a similaridade da espécie e o local de origem, e testou-se o seu potencial de produção de enterotoxinas (SE) A, B, C e D, e da toxina da síndrome do choque tóxico (TSST-1). Constatou-se que 62,2% dos *pools* foram capazes de produzir, de forma individual ou associada, SEA (33,3%); SEB (46,7%); SEC (8,9%); SED (4,4%) e TSST-1 (4,4%). Dos *pools* enterotoxigênicos, 96,4% corresponderam a espécies coagulase negativa (*Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus cohnii*). A capacidade de produção de SE e de TSST-1 pelas cepas de *Staphylococcus* spp. isoladas dos manipuladores, além de reafirmar sua importância na transmissão de intoxicações de origem alimentar, enfatiza a necessidade imprescindível da adoção de condutas higiênicas e sanitárias durante a manipulação do alimento.

Palavras-chave: cabra, manipulador, queijo, *Staphylococcus*, enterotoxinas, TSST-1

ABSTRACT

A total of 167 strains of *Staphylococcus* isolated from nasal cavities, oropharynx, palm of hands and subungual of two goat's cheese handlers were collected. The strains were pooled (45) according to the species similarity and place of origin and tested for the production of enterotoxins (SE) A, B, C, D and toxic shock toxin syndrome (TSST-1). It was observed that 62.2% of the pools presented the capacity to produce, individually or in association, SEA (33.3%); SEB (46.7%); SEC (8.9%); SED (4.4%) and TSST-1 (4.4%). From the enterotoxigenic pools, 96.4% corresponded to species negative coagulase (*Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus cohnii*). The capacity to produce SE and TSST-1 by *Staphylococcus* spp. strains isolated from food handlers reaffirms its role on the transmission of food poisoning, beyond emphasizing the indispensable necessity of the adoption of satisfactory hygienic and sanitary procedures during the food manufacture.

Keywords: goat, cheese handlers, *Staphylococcus*, enterotoxins, TSST-1

Recebido para publicação em 13 de setembro de 2004

Recebido para publicação, após modificações, em 17 de fevereiro de 2005

*Autor para correspondência (*corresponding author*)

E-mail: monicerq@vet.ufmg.br

INTRODUÇÃO

Uma das vias mais freqüentes de transmissão de microrganismos aos alimentos é o manipulador (Souza et al., 1998). Indivíduos doentes (carreamento transitório) ou portadores assintomáticos de microrganismos patogênicos (carreamento residente) podem, em função de falhas higiênico-sanitárias durante a manipulação, contaminar os alimentos (El sistema..., 1991), dando origem a surtos de doenças transmissíveis por alimentos (DTA). Nos Estados Unidos, os manipuladores de alimentos foram responsáveis por 657 surtos de DTA entre os anos de 1961 a 1992 (Bryan, 1988; Bean et al., 1990; Bean et al., 1997).

A intoxicação no homem por espécies de *Staphylococcus* é um dos tipos mais comuns de doença transmissível por alimento, sendo *Staphylococcus aureus* a espécie mais envolvida (Bergdoll, 1990). Nos Estados Unidos, de um total de 296 surtos de DTA de origem estafilocócica ocorridos entre 1961 e 1982, 48,6% originaram-se dos manipuladores (Bryan, 1988), enquanto no período seguinte, de 1983 a 1992, dos 91 surtos de DTA de origem estafilocócica, 25,3% foram relacionados aos mesmos (Bean et al., 1990; Bean et al., 1997).

No homem, *Staphylococcus* pode estar presente no conduto nasal, nos olhos, na garganta, no trato gastrointestinal e na superfície da pele, onde é mais freqüente nas mãos, braços, rosto e feridas. A partir dessas localizações, o microrganismo pode contaminar o alimento direta ou indiretamente (Jay, 1993). Estima-se que de 5 a 10% das pessoas podem apresentar *S. aureus* nas mãos (El sistema..., 1991). Carvalho e Serafini (1996) acrescentam que estes podem, por meio do contato direto ou indireto, perpetuar a cadeia epidemiológica da intoxicação alimentar estafilocócica.

A literatura reconhece, até o momento, 14 tipos de enterotoxinas estafilocócicas (SE): SEA, SEB, SEC₁, SEC₂, SEC₃, SED, SEE, SEG, SEH, SEI, SEJ (Carmo et al., 2002), SEK (Orwin et al., 2001), SEL e SEM (Jarraud et al., 2001), podendo algumas dessas ser produzidas no alimento em contagens mínimas de 10⁵ a 10⁶ UFC/ml (Su e Wong, 1997) e até de 10³ UFC/g (Carmo et al., 2002). Os estafilococos são facilmente destruídos por tratamentos térmicos,

como a pasteurização, mas suas SE, termoestáveis, permanecem ativas nos alimentos tornando-se um risco em potencial para a saúde do consumidor e um problema para a saúde pública (Carmo et al., 2002).

As SE são responsáveis por quadros de intoxicação alimentar estafilocócica no homem, caracterizados por náusea, vômito, diarreia, dor de cabeça, cólica abdominal, câibra muscular, queda de pressão sanguínea e prostração. Em casos graves, o indivíduo pode necessitar de cuidados médicos; crianças e idosos podem chegar ao óbito (Carmo, 1997).

Além destas, algumas linhagens de *Staphylococcus* produzem a toxina da síndrome do choque tóxico (TSST-1) (Santos, 2003) cujos sintomas são agudos, potencialmente fatais e caracterizados por febre alta, descamação da pele e hipotensão (Chesney, 1989, citado por Lamaita, 2003). Esta síndrome, diferentemente da gastroenterite causada pelas SE, ainda não foi associada ao consumo de alimentos. No entanto, sua presença no alimento pode indicar uma possível fonte de veiculação dessa enfermidade para o homem (Sena, 2000), além de se constituir em fator de virulência da linhagem.

Este trabalho teve como objetivos isolar e identificar espécies de *Staphylococcus* a partir de sítios específicos e testar a capacidade enterotoxigênica por meio da indução da produção de SEA, SEB, SEC SED e TSST-1.

MATERIAL E MÉTODOS

Coletaram-se suabes de superfície, conforme a técnica descrita por Compendium... (1992), dos seguintes sítios de dois manipuladores de um laticínio de queijo de leite de cabra: palma das mãos, leitos subungueais, fossas nasais e orofaringe. As amostras foram acondicionadas e transportadas em caixas isotérmicas contendo gelo até o laboratório de microbiologia, onde se realizaram a contagem e o isolamento de *Staphylococcus* spp., segundo Compendium... (1992).

No laboratório de enterotoxinas estafilocócicas da Fundação Ezequiel Dias, a partir de cepas típicas e atípicas de *Staphylococcus* spp. do manipulador A (47 das fossas nasais, sete da

Presença de *Staphylococcus spp...*

orofaringe, seis da palma das mãos e 20 dos leitos subungueais) e do manipulador B (51 das fossas nasais, quatro da orofaringe, sete da palma das mãos e 25 dos leitos subungueais), realizaram-se as provas bioquímicas para a identificação das espécies por meio dos testes de catalase, coagulase, termonuclease, hemólise e fermentação de açúcares (manitol e maltose), segundo as técnicas descritas por Mac Faddin (1980), Bergdoll (1989) e Kloos e Labble Jr. (1990). As espécies similares e do mesmo local de origem foram agrupadas em *pools* (45) e testadas quanto ao potencial de produção das enterotoxinas (SE) A, B, C, D e da TSST-1 pelo

método de membrana sobre ágar descrito por Hallender (1965). A identificação das SE e da TSST-1 foi realizada pelo método de sensibilidade ótima em placa (OSP), descrita por Robbins et al. (1974).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os *pools* das espécies de *Staphylococcus* isoladas dos diferentes sítios dos manipuladores, bem como a capacidade de produção de SE e TSST-1, de forma isolada ou associada, encontram-se na Tab. 1.

Tabela 1. Produção de enterotoxinas (SE) e da toxina da síndrome do choque tóxico (TSST-1) pelas espécies de *Staphylococcus* isoladas dos diferentes sítios dos manipuladores

	Sítio de coleta	Espécie	Pools		Enterotoxina/Toxina			
			n	%				
Manipulador A	Fossas nasais	<i>S. epidermidis</i>	7	(15,5%)	B	A e B	A e B	A e C
	Leitos subungueais	<i>S. epidermidis</i>	2	(4,4%)	A, B e C	-	-	-
		<i>S. cohnii</i>	4	(8,9%)	B	-	-	-
		<i>S. aureus</i>	3	(6,7%)	A	A, B e C	TSST-1	-
	Mãos	<i>S. epidermidis</i>	2	(4,4%)	-	-	-	-
		<i>S. cohnii</i>	1	(2,2%)	A, B e D	-	-	-
		<i>S. epidermidis</i>	4	(8,9%)	B	-	-	-
Orofaringe	<i>S. epidermidis</i>	4	(8,9%)	A, B, C e D	-	-	-	
	<i>S. aureus</i>	1	(2,2%)	B	-	-	-	
Total			24	(53,3%)				
Manipulador B	Fossas nasais	<i>S. epidermidis</i>	8	(17,8%)	A	B	B	A e B
	Leitos subungueais	<i>S. epidermidis</i>	5	(11,1%)	A e B	-	-	-
		<i>S. cohnii</i>	4	(8,9%)	A	B	B	TSST-1
	Mãos	<i>S. epidermidis</i>	2	(4,4%)	B	-	-	-
		<i>S. cohnii</i>	1	(2,2%)	-	-	-	-
	Orofaringe	<i>S. epidermidis</i>	1	(2,2%)	A e B	-	-	-
	Total			21	(46,7%)	A e B	-	-
Total (MA + MB)			45	100%	45	100%		

Do total dos 45 *pools* de espécies de *Staphylococcus*, 68,9% corresponderam ao *S. epidermidis*, 22,2% ao *S. cohnii* e 8,9% ao *S. aureus*. Quanto à enterotoxigenicidade, 37,8% dos *pools* não produziram SE e/ou TSST-1. Dos 62,2% que produziram alguma SE e/ou TSST-1 de forma individual ou associada, 33,3% corresponderam a SEA, 46,7% a SEB, 8,9% a SEC, 4,4% a SED e 4,4% a TSST-1.

Staphylococcus aureus enterotoxigênico tem sido isolado do vestíbulo nasal de manipuladores de alimentos produtores de SEC, SEB, SEC, SEA + SEE e SEA + SEB + SEE (Castro e Iaria, 1984)

e de SEA, SEB, SEC, SED, SEA + SEC e SEC + SED (Fueyo et al., 2001).

Uma vez que o homem pode carrear cepas de *Staphylococcus* enterotoxigênicos de maneira transitória ou residente em diversos sítios (superfície da pele, fossas nasais, orofaringe, feridas supurativas, etc), tornam-se significativas as chances de veiculação delas para os alimentos. Neste estudo, a detecção de cepas de espécies de *Staphylococcus* produtores de SE dos diferentes sítios de ambos os manipuladores sugere o potencial risco de contaminação para os queijos, caso sejam negligenciados os cuidados

higiênicos e sanitários durante sua manipulação. Vários surtos de toxinfecção alimentar estafilocócica devido ao consumo de queijos são relatados na literatura (Carmo et al., 2002; Veras et al., 2003).

Dos 28 *pools* que apresentaram potencial toxigênico, 96,4% corresponderam a espécies de *Staphylococcus* coagulase negativa, representadas por *S. epidermidis* e *S. cohnii*. Santos (2003) descreveu a toxigenicidade de 63,2% das cepas de *S. epidermidis* e de 84,6% das cepas de *S. cohnii* isoladas dos manipuladores de alimentos envolvidos em surtos de intoxicação alimentar. A toxigenicidade das cepas coagulase negativa tem sido descrita (Sena, 2000; Machado, 2001; Lamaita, 2003) e surtos de intoxicação alimentar em produtos lácteos (Carmo et al., 2002; Veras et al., 2003) confirmaram a importância desse grupo para a saúde pública.

A partir das cepas de *Staphylococcus* coagulase positiva e coagulase negativa isoladas das fossas nasais, orofaringe e leitos subungueais de manipuladores, Machado (2001) descreveu a capacidade de produção de SEA e SEA + SEB, enquanto Santos (2003) relatou a capacidade de produção de SEA, SEB, SEC, SED e TSST-1 em manipuladores envolvidos em surtos de intoxicação alimentar em Minas Gerais.

Enquanto as SE são cientificamente comprovadas como as responsáveis pelos quadros de intoxicação alimentar estafilocócica no homem, a pesquisa pela TSST-1 é da mesma forma relevante, apesar de ainda não ter sido associada ao consumo de alimentos. Isto porque sua presença pode indicar riscos de produção de SE (Sena, 2000), aumentando a patogenicidade das linhagens produtoras.

O potencial de produção da TSST-1 verificado a partir de um *pool* de *S. epidermidis* e de outro de *S. cohnii* foi também constatado por Santos (2003) em linhagem de *Staphylococcus* coagulase negativa. Veras et al. (2003), ao investigarem surtos dessa natureza originados de derivados lácteos, isolaram cepas enterotoxigênicas produtoras dessa toxina na bebida láctea (SEB + TSST-1), no queijo canastra (SEC + TSST-1) e no queijo ralado (SEB + TSST-1).

Lamaita (2003) enfatiza que os padrões legais para alimentos especificam apenas a presença de espécies coagulase positiva e reforça a necessidade de revisão da legislação brasileira, incluindo *Staphylococcus* coagulase negativa, dada sua importância do ponto de vista de segurança alimentar.

A partir da comprovação *in vitro* da capacidade enterotoxigênica de cepas de *Staphylococcus* coagulase negativa, torna-se essencial e urgente a revisão da atual legislação sanitária de alimentos pelos órgãos oficiais do governo no sentido de incluir padrões para *Staphylococcus* coagulase negativa visando, desta forma, resguardar a saúde pública.

A capacidade de produção de SE e de TSST-1 pelas cepas de *Staphylococcus* spp. isoladas de manipuladores, associada a relatos similares descritos na literatura, ressalta a sua importância na veiculação de cepas enterotoxigênicas para os alimentos e enfatiza a necessidade imprescindível da conduta higiênica e sanitária durante sua manipulação.

Diante da identificação de cepas de *Staphylococcus* coagulase negativa enterotoxigênicas, torna-se imprescindível uma revisão urgente da atual legislação sanitária de alimentos pelos órgãos oficiais de inspeção e vigilância sanitária com inclusão de padrões para *Staphylococcus* coagulase negativa.

CONCLUSÕES

A presença de cepas de *Staphylococcus* spp. produtores de enterotoxinas e da toxina TSST-1, a partir de diferentes sítios dos manipuladores, sugere a possibilidade de sua veiculação para os queijos, com risco à saúde pública.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BEAN, N.H.; GOULDING, J.S.; DANIELS, M.T. et al. Surveillance for food borne disease outbreaks - United States, 1988-1992. *J. Food Prot.*, v.60, p.1265-1286, 1997.
- BEAN, N.H.; GRIFFIN, P.M.; GOULDING, J.S. et al. Food borne disease outbreaks, 5 year summary, 1983-1987. *J. Food Prot.*, v.53, p.711-728, 1990.

Presença de *Staphylococcus spp...*

- BERGDOLL, M.S. Staphylococcal food poisoning. In: CLIVER, D.O. (Ed.). *Foodborne diseases*. San Diego: Academic, 1990. p.86-106.
- BERGDOLL, M.S. *Staphylococcus aureus*. In: DOYLE, M.P. (Ed.). *Foodborne bacterial pathogens*. New York: Marcel Bekker, 1989. p.463-523.
- BRYAN, F.L. Risks of practices, procedures and processes that lead to outbreaks of foodborne diseases. *J. Food Prot.*, v.51, p.663-673, 1988.
- CARMO, L.S. *Produção e purificação das enterotoxinas estafilocócicas A, B, C e D*. 1997. 177f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia)- Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- CARMO, L.S.; DIAS, R.S.; LINARDI, V.R. et al. Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in Minas Cheese and raw milk in Brasil. *Food Microbiol.*, v.19, p.9-14, 2002.
- 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.
- CASTRO, M.M.M.V.; IARIA, S.T. *Staphylococcus aureus* enterotoxigênico no vestibulo nasal de manipuladores de alimentos de cozinhas hospitalares do município de João Pessoa, PB, Brasil. *Rev. Saúde Públ.*, v.18, p.235-245, 1984.
- CHESNEY, P.J. Clinical aspects and spectrum of illness of toxic shock syndrome: overview. *Rev. Infect. Dis.*, v.11, p.51-57, 1989.
- COMPENDIUM of methods for the examination of foods. 3.ed. Washington: APHA, 1992. 1219p.
- EL SISTEMA de analisis e riesgos y puntos criticos: su aplicación a las industrias de alimentos. Zaragoza: Acribia, 1991. 334p.
- FUEYO, J.M.; MARTIN, M.C.; GONZALEZ-HEVIA, M.A., et al. Enterotoxin production and DNA fingerprinting in *Staphylococcus aureus* isolated from human and food samples. Relations between genetic types and enterotoxins. *Int. J. Food Microbiol.*, v.67, p.139-145, 2001.
- HALLANDER, H.O. Production of Large Quantities of Enterotoxin B and Other Staphylococcal Toxins on Solid Media. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* v.63, p.299-305, 1965.
- JARRAUD, S.; PEYTRAT, M.A.; LIM, A. et al. A highly prevalence operon of enterotoxin gene, forms a putative nursery of superantigens in *Staphylococcus aureus*. *J. Immunol.*, v.166, p.669-677, 2001.
- JAY, J.M. *Microbiología moderna de los alimentos*. 3.ed. Zaragoza: Acribia, 1993. 804p.
- KLOOS, W.E.; LABBLE JR., D.W. *Staphylococcus*. In: BALOWS, A. *Manual of clinical microbiology*. 5.ed. Washington: American Society of Microbiology, 1990. 1500p.
- LAMAITA, H.C. *Frequência de espécies de Staphylococcus, de TSST-1 e de enterotoxinas estafilocócicas em leite cru refrigerado em propriedades de Minas Gerais*. 2003. 74f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- MAC FADDIN, J.F. *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*. Buenos Aires: Panamericana, 1980. 301p.
- MACHADO, E.C. *Monitoramento de perigos e pontos criticos de controle em estimativa de riscos em uma indústria mineira de pão-de-queijo*. 2001. 129f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- ORWIN, P.M.; LEUNG, D.Y.M.; DONAHUE, H.L. et al. Biochemical and biological properties of *Staphylococcal* enterotoxin K. *Inf. Immun.*, v.69, p.360-366, 2001.
- ROBBINS, R.; GOULA, S.; BERGDOLL, M.S. Detecting the enterotoxigenicity of *S. aureus* strains. *Appl. Microbiol.*, v.28, p.946-950, 1974.
- SANTOS, D.A. *O papel do manipulador de alimentos em surtos de intoxicação alimentar causados por espécies de Staphylococcus ocorridos em quatro cidades do Estado de Minas Gerais, Brasil*. 2003. 85f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- SENA, M.J. *Perfil epidemiológico, resistência a antibióticos e aos conservantes nisina e sistema de lactoperoxidase de Staphylococcus spp. isolados de queijos coalho comercializados em Recife*. 2000. 75f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- SOUZA, C.M.; BRAGANÇA, M.G.; COLI, M.C.M et al. *Manual de boas práticas de fabricação de pão de queijo*. Belo Horizonte: CETEC, 1998. 54p.
- SU, Y.; WONG, L.A.C. Current perspectives on detection of staphylococcal enterotoxins. *J. Food Prot.*, v.60, p.195-202, 1997.
- VERAS, J.F.; SANTOS, D.A.; CARMO, L.S. et al. Levantamento de surtos de toxinfecção alimentar envolvendo leite e produtos derivados no estado de Minas Gerais, Brasil. *Hig. Alim.*, v.17, p.218, 2003.