



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS ANIMAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

GERMANA GUIMARÃES REBOUÇAS

**GENES ENTEROTOXIGÊNICOS E RESISTÊNCIA À METICILINA
EM *Staphylococcus aureus* ISOLADOS DE LEITE CAPRINO**

MOSSORÓ-RN
2015

GERMANA GUIMARÃES REBOUÇAS

**GENES ENTEROTOXIGÊNICOS E RESISTÊNCIA À METICILINA
EM *Staphylococcus aureus* ISOLADOS DE LEITE CAPRINO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), como exigência final para obtenção do título de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal.

Orientador: Dr. Jean Berg Alves da Silva - UFERSA

MOSSORÓ-RN
2015

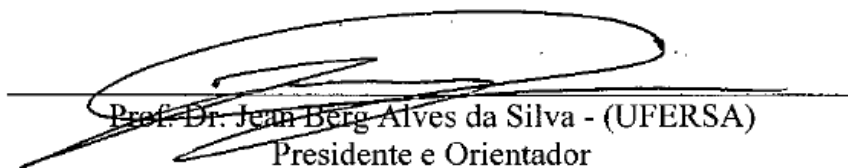
GERMANA GUIMARÃES REBOUÇAS

**GENES ENTEROTOXIGÊNICOS E RESISTÊNCIA À METICILINA
EM *Staphylococcus aureus* ISOLADOS DE LEITE CAPRINO**

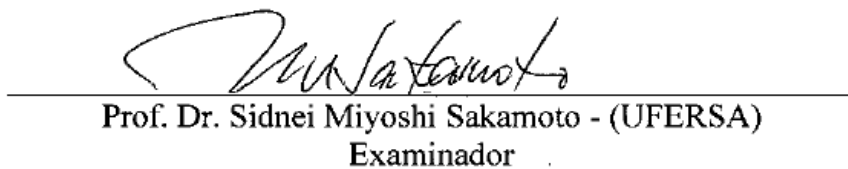
Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural
do Semi-Árido (UFERSA), como exigência final para
obtenção do título de Mestre no Curso de Pós-Graduação
em Ciência Animal.

Aprovação em 28 de Setembro de 2015

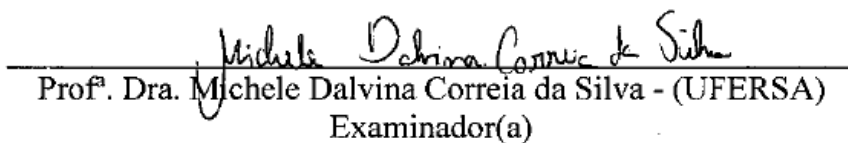
BANCA EXAMINADORA:



Prof. Dr. Jean Berg Alves da Silva - (UFERSA)
Presidente e Orientador



Prof. Dr. Sidnei Miyoshi Sakamoto - (UFERSA)
Examinador



Profª. Dra. Michele Dalvina Correia da Silva - (UFERSA)
Examinador(a)

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

GERMANA GUIMARÃES REBOUÇAS, filha de Hermano José Rebouças e Edinair Guimarães Lima Rebouças, nasceu em 05 de maio de 1991, na cidade de Russas, estado do Ceará. Concluiu o ensino médio na Unidade Educacional Coração Imaculado de Maria – UNECIM, em Russas. Em 2009, iniciou o ensino superior no curso de Biotecnologia na Universidade Federal Rural do Semi-árido (UFERSA), graduando-se em outubro de 2013. Como acadêmica atuou como estagiária na área de Microbiologia e foi bolsista de iniciação científica do CNPq no Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal-LIPOA. No mesmo mês que graduou-se, ingressou no Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, da UFERSA, no qual foi bolsista CAPES. No decorrer do curso, realizou estágio em docência na disciplina de Microbiologia Geral para os cursos de Biotecnologia e Ecologia da UFERSA. Atuando na linha de pesquisa em Sanidade Animal, adquiriu experiência na área de Microbiologia e Biologia Molecular.

DEDICATÓRIA

*Aos meus amados pais, Hermano e Edinair,
por todo amor, incentivo e por sempre acreditarem em mim.
Ao meu avô, Raimundo Nonato, pela torcida e orações constantes.
Aos meus irmãos, Amanda e Hermano Filho, pelo apoio
e por sempre alegrarem-se com minhas conquistas.
Ao meu querido esposo Nilberto, por todo amor,
companheirismo e paciência.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus por me mostrar todos os dias o quanto estar presente em minha vida, me abençoando e guiando meus caminhos, muitas vezes sem eu merecer. Obrigada senhor por todas as graças alcançadas e por ter chegado até aqui ainda com forças e vontade de seguir em frente na realização dos meus sonhos.

Aos meus Pais, Hermano e Edinair por estarem ao meu lado em todos os momentos, sendo minha base, minha fonte inesgotável de força, determinação e coragem. Sem seus esforços e dedicação de uma vida, nada disso seria possível.

Aos meus irmãos, Amanda e Hermano filho, por todo apoio e torcida. Porque a vitória de um sempre será a do outro, que seja assim sempre.

Ao meu amado esposo, Nilberto, a quem muito me orgulho, admiro e me espelho. Obrigada, por todo apoio, incentivo e parceria.

Ao nosso patriarca da família Rebouças, meu estimado avô Raimundo Nonato, por todos os ensinamentos passados. Vida longa a ti meu avô, para que possamos compartilhar ainda mais momentos felizes. Muito obrigada.

Ao meu Orientador Prof. Dr. Jean Berg, pela grande oportunidade, paciência e compreensão. Para mim foi uma honra conviver com este ser humano de caráter e humildade incontestável, que se refletem no profissional admirado e respeitado que é. A ele, minha eterna gratidão. Obrigada por tudo.

À querida e competente, Rociene, companheira de LIPOA durante tantos anos e com quem muito aprendi. Obrigada pela grande ajuda na realização deste trabalho.

À família LIPOA, que sempre se empenha com tanta dedicação, responsabilidade e parceria em todos os projetos. Juntos passamos a fazer parte das vidas uns dos outros e a compartilhar não só conhecimentos. Dividimos medos, incertezas e inseguranças. Somamos entusiasmos, forças e alegrias. Tornamo-nos amigos! Obrigada.

A todos do laboratório de Zoonoses Bacterianas da USP, pelo acolhimento e grande ajuda neste trabalho. Em especial ao professor Marcos e a técnica Gisele.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro de grande importância para a realização deste trabalho.

A todos os professores com quem tive a oportunidade de aprender durante estes 2 anos de Mestrado, meu muito obrigada.

EPÍGRAFE

*“Valeu a pena? Tudo vale a pena
Se a alma não é pequena.
Quem quer passar além do Bojador
Tem que passar além da dor.
Deus ao mar o perigo e o abismo deu,
Mas nele é que espelhou o céu”.*

Fernando Pessoa

GENES ENTEROTOXIGÊNICOS E RESISTÊNCIA À METICILINA EM *Staphylococcus aureus* ISOLADOS DE LEITE CAPRINO

REBOUÇAS, Germana Guimarães. **Genes enterotoxigênicos e resistência à meticilina em *Staphylococcus aureus* isolados de leite caprino**. 2015. 66f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal: Sanidade Animal) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró-RN, 2015.

RESUMO: O objetivo do presente trabalho foi investigar a presença de genes enterotoxigênicos e de resistência à meticilina em *Staphylococcus aureus* isolados de leite caprino obtido de produtores do estado do Rio Grande do Norte. Para a realização do estudo, realizou-se a pesquisa de *S. aureus* em 49 amostras de leite caprino. O isolamento foi realizado em placas Petrifilm™, modelo Staph Express 3M e identificadas bioquimicamente. Em seguida, os isolados foram submetidos a avaliação quanto ao perfil de resistência a antibióticos, utilizando a técnica de difusão em discos em Agar Mueller-Hinton. Seguiu-se com a realização da reação em cadeia pela polimerase (PCR) para pesquisa dos seguintes genes selecionados: *16S rRNA* (para identificação molecular dos *S. aureus*), *mecA* (que caracteriza *S. aureus* resistente à meticilina) e genes enterotoxigênicos (*sea*, *seb-sec*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, *sei*, *sej* e *tsst-1*). Os resultados das análises morfológicas e bioquímicas revelaram que todos os isolados pertenciam a espécie *Staphylococcus aureus*. Observou-se através do antibiograma realizado um maior percentual de resistência para os antimicrobianos penicilina G (87,75%) e oxacilina (75,51%). Multirresistência foi verificada em 73,46% dos isolados. Com a análise da PCR, confirmou-se que 100% dos isolados eram *S. aureus*, pela amplificação do gene *16S rRNA*. O gene *mecA* foi detectado em 4,08% das amostras. Na pesquisa de enterotoxinas estafilocócicas (SE), nas amostras confirmadas para *S. aureus*, houve amplificação em 79,5 % dos fragmentos do gene *sej*, seguido de 48,9% do gene *sei*, 22,4% do gene *sed*, 12,2% para o gene *sea*, 8,1% para os genes *seh* e *seg* e 2% para o gene *sec*. Não foi observada nenhuma amplificação para os genes *seb-sec*, *see* e *Tsst-1*. As amostras de *S. aureus* isoladas a partir do leite caprino demonstraram presença de genes responsáveis pela produção de toxinas, fato que exige um maior cuidado no tratamento deste leite pela indústria de alimentos. Além disso a resistência aos antibióticos e detecção do gene *mecA* também leva a preocupação, podendo representar riscos à saúde do consumidor.

PALAVRAS CHAVE: qualidade microbiológica, antibiograma, enterotoxinas estafilocócicas, PCR.

ENTEROTOXIGENIC GENES AND RESISTANCE TO METHICILLIN IN *Staphylococcus aureus* ISOLATED FROM GOAT MILK

REBOUÇAS, Germana Guimarães. **Enterotoxigenic genes and resistance to methicillin in *Staphylococcus aureus* isolated from goat milk**. 2015. 66f. Dissertation (Master Degree in Animal Science: Animal Health) - Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoro-RN, 2015.

ABSTRACT: The aim of this study was to investigate the presence of enterotoxigenic and methicillin-resistant genes in *Staphylococcus aureus* isolated from goat milk obtained from Rio Grande do Norte state producers. To achieve such goal, 49 samples of goat milk and searched for *S. aureus*. The colonies were isolated in Petrifilm™ plates, Staph Express 3M model and biochemically identified. Afterwards, the isolated strains underwent an assessment to evaluate their antibiotic resistance profile, through the use of disk diffusion technique on Mueller-Hinton agar. Following we carried out a polymerase chain reaction (PCR) to search for the following selected genes: *16S rRNA* (for molecular identification of *S. aureus*), *mecA* (characterizes the methicillin-resistant *S. aureus*) and enterotoxigenic genes (*sea*, *seb-sec*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, *sei*, *sej* and *tsst-1*). Results from morphological and biochemical analyses revealed that all isolated strains belonged to the *Staphylococcus aureus* species. We also observed, through the antibiogram, high percentage of resistance to the antibiotics penicillin G (87.75%) and oxacillin (75.51%). Multidrug resistance was detected in 73.46% of the isolated strains. Analyzing the PCR, we confirmed that 100% of the isolated strains were *S. aureus* because of the amplification of the *16S rRNA* gene. The *mecA* gene was found in 4.08% of the samples. In samples confirmed as *S. aureus*, concerning the research for staphylococcal enterotoxins (SE), there was amplification of the *sej* gene fragments in 79.5% of the samples, followed by the *sei* gene in 48.9%, *sed* gene in 22.4%, *sea* gene in 12, 2%, *seh* and *sec* genes in 8.1%, and *sec* gene in 2% for the samples. We did not observe any amplification for the *seb-sec*, *see* and *tsst-1* genes. The strains of *S. aureus* isolated from goat milk have shown the presence of genes responsible for the production of toxins, a fact that requires greater care when processing this milk in the dairy industry. In addition, to antibiotic resistance and detection of *mecA* gene also leads to concern, can pose risks to consumer health.

KEYWORDS: microbiological quality, antibiogram, staphylococcal enterotoxins, PCR.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I

Figura 1- Representação do anel beta-lactâmico presente em todo o grupo de antibióticos β -lactâmicos.....25

Capítulo II

Figura 1 - Eletroforese em gel de agarose para pesquisa do gene *16S rRNA* (228 pb) pela técnica de PCR. L: Ladder 100pb; CP: Controle Positivo Cepa ATCC 33591; CN: Controle Negativo MIX ausente de DNA; Amostras positivas: 1 a 1641

Figura 2 - Detecção de fragmentos de genes amplificados a partir de DNA genômico extraído de *S. aureus* isolados de leite caprino..... 42

LISTA DE TABELAS

Capítulo I

Tabela 1 - Caraterísticas das enterotoxinas estafilocócicas mais ocorrentes.....	21
--	----

Capítulo II

Tabela 1 - Iniciadores utilizados na PCR para identificação de genes enterotoxigênicos, gene <i>16S rRNA</i> e gene <i>mecA</i> em <i>S. aureus</i> isolados de leite caprino.....	39
--	----

Tabela 2 - Perfil de resistência e sensibilidade de <i>S. aureus</i> isolados de leite caprino a antibióticos.....	40
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

% - Porcentagem

°C - grau Celsius

DNA – ácido desoxirribonucléico

DTA – Doenças transmitidas por alimentos

DVA – Doenças veiculadas por alimentos

g - grama

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.

KDa- quilodaltons

min - minuto

mL - mililitros

MRSA- *S. aureus* resistente à meticilina

NaCl – Cloreto de sódio

PBP – *Penicillin Binding Protein*

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

pH – Potencial hidrogeniônico

RN – Rio Grande do Norte

S. aureus – *Staphylococcus aureus*

SCCmec - Cromossômico Estafilocócico mec

SE - Enterotoxinas Estafilocócicas

TSST-1 - toxina 1 do choque tóxico estafilocócico

UFC – Unidade Formadora de Colônia

UFERSA – Universidade Federal Rural do Semi-Árido

µg – micrograma

VRSA - *S. aureus* vancomicina resistente

SUMÁRIO

CAPÍTULO I: CONSIDERAÇÕES INICIAIS E REVISÃO DE LITERATURA

1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS	16
2 OBJETIVOS	17
2.1 GERAL	17
2.2 ESPECÍFICOS	17
3 REVISÃO DE LITERATURA	18
3.1 DOENÇAS VEICULADAS POR ALIMENTOS (DVA)	18
3.2 LEITE DE CABRA.....	18
3.3 <i>Staphylococcus aureus</i>	19
3.4 ENTEROTOXINAS ESTAFILOCÓCICAS	20
3.4.1. Características genéticas das toxinas produzidas por <i>S. aureus</i>	22
3.4.2 Intoxicação alimentar estafilocócica	23
3.4.3 Síndrome do choque tóxico estafilocócico	23
3.5 RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA	24
3.5.1 β - lactâmicos	25
3.5.2 <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina (MRSA).....	26
4 REFERÊNCIAS	28

CAPÍTULO II: DETECÇÃO DE GENES ENTEROTOXIGÊNICOS E DO GENE *mecA* EM *Staphylococcus aureus* ISOLADOS DE LEITE CAPRINO

RESUMO	35
ABSTRACT	35
1 INTRODUÇÃO	36
2 MATERIAL E MÉTODOS	37
2.1 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE <i>S. aureus</i>	37
2.2 DETERMINAÇÃO FENOTÍPICA DO PERFIL DE RESISTÊNCIA DOS <i>S. aureus</i>	37
2.3 TESTES MOLECULARES	37
2.3.1 Extração do DNA genômico	37
2.3.2 Amplificação por PCR do gene <i>16S rRNA</i>	38
2.3.3 Amplificação por PCR do gene <i>mecA</i>	38
2.3.4 PCR Multiplex para detecção de genes enterotoxigênicos	38
2.3.5 Visualização dos produtos da PCR.....	38
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
4 CONCLUSÃO	43
5 REFERÊNCIAS	43

APÊNDICE47

CAPÍTULO I

CONSIDERAÇÕES INICIAIS E REVISÃO DE LITERATURA

1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

A crescente disseminação da produção do leite caprino pode estar associada a sua elevada digestibilidade, valor nutricional e por ser adequado ao consumo alternativo por pessoas que possuem intolerância ao leite bovino (MENDES et al., 2009). Devido ao aumento do consumo e da produção deste leite, cuidados em relação a sua qualidade microbiológica são motivo de preocupação, o que torna necessária a adoção de medidas que possam assegurar a saúde do consumidor (SILVA et al., 2015).

Staphylococcus aureus está entre os micro-organismos mais envolvidos em contaminações, que podem levar a quadros de intoxicações alimentares devido a sua capacidade de produzir enterotoxinas (OSTYN et al., 2009).

Intoxicações alimentares são definidas como doenças de origem alimentar causadas pela ingestão de alimentos contendo toxinas microbianas previamente elaboradas durante a intensa proliferação de micro-organismos patogênicos (FRANCO; LANDGRAFF, 1996). Contagens estafilocócicas mínimas de 10^5 UFC/g de alimento levam a produção dessas enterotoxinas (BRASCA et al., 2005). O quadro clínico dessas intoxicações é caracterizado por sintomas como: náuseas, vômito, cefaleia, cólicas abdominais, diarreia, sudorese e prostração (OSTYN et al., 2009).

S. aureus também é responsável por ocasionar a síndrome do choque tóxico estafilocócico, que é constantemente ocasionada por cepas produtoras da TSST-1(toxina 1 do choque tóxico estafilocócico). O tratamento destas intoxicações é realizado através de terapia antimicrobiana e a crescente disseminação de *S.aureus* resistente à meticilina (MRSA) é motivo de alerta (DEVRIES et al., 2011).

A detecção de enterotoxinas é epidemiologicamente essencial, em particular para a indústria de alimentos, devido a habilidade de algumas linhagens de *S. aureus* produzirem enterotoxinas termoestáveis (BERGDOLL, 1989). Métodos baseados na amplificação de DNA (Reação em cadeia pela polimerase - PCR) podem demonstrar a presença de linhagens de *S. aureus* toxigênicas, antes da expressão das toxinas, e, com isso detectar a fonte potencial de contaminação (HOLECKOVÁ et al., 2002). Dessa forma, o objetivo da pesquisa foi investigar a presença de genes enterotoxigênicos e de resistência à meticilina em *S. aureus* isolados de leite caprino.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Investigar a presença de genes enterotoxigênicos e de resistência à meticilina em *Staphylococcus aureus* isolados de leite caprino.

2.2 ESPECÍFICOS

- a) Identificar bioquimicamente *S. aureus* isolados de leite caprino;
- b) Avaliar fenotipicamente o perfil de resistência dos *S. aureus* isolados de leite caprino a antibióticos;
- c) Identificar *S. aureus* isolados de leite caprino pela presença do gene *16S rRNA*;
- d) Pesquisar a presença de *S. aureus* isolados de leite caprino resistentes à meticilina pela detecção do gene *mecA*;
- e) Detectar genes que codificam as toxinas *sea*, *seb-sec*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, *sei*, *sej* e *tsst-1* em *S. aureus* isolados de leite caprino.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 DOENÇAS VEICULADAS POR ALIMENTOS (DVA)

As Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA), mais recentemente denominadas Doenças Veiculadas por Alimentos (DVA) compreendem mais de 250 tipos, onde muitas são resultantes da ingestão de alimentos contaminados por micro-organismos patogênicos ou por suas toxinas pré-formadas, causando sérios riscos para a saúde dos consumidores, além de grandes perdas econômicas (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2006; SILVA, 2008; BUZBY; ROBERTS, 2009).

Surtos de DVA geralmente estão associados ao consumo de alimentos visivelmente bons, isto é, de boa aparência, sabor e odor normais. Desse modo, os alimentos causadores de doenças alimentares são, por vezes, difíceis de serem identificados, pois a concentração microbiana necessária para desencadear doenças é menor do que a concentração necessária para degradar os alimentos. Por isso, alimentos notoriamente contaminados são raramente responsáveis por surtos, já que suas características organolépticas são desagradáveis e provocam sensação repulsiva. Nessa situação a contaminação microbiana pode ultrapassar 10^8 UFC/g de alimento, e o hábito de “provar para ver se está bom” pode ser bastante arriscado (FORSYTHE, 2010).

O consumo de alimentos contaminados, provenientes de manipulação inadequada e da conservação ou distribuição em condições impróprias, representam as principais origens dos surtos alimentares que acometem o homem (GREIG; RAVEL, 2009). Assim, alimentos contaminados em proporções que não seriam capazes de provocar surtos, em condições errôneas de conservação podem permitir e/ou facilitar a multiplicação microbiana, aumentando a probabilidade para ocorrência de surtos alimentares (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2006; GREIG; LEE, 2009). Segundo Welker et al. (2010), as bactérias são as principais causadoras de doenças alimentares.

3.2 LEITE DE CABRA

No Brasil, o leite caprino tem exercido grande importância econômica (ANDRADE et al., 2012), sendo na região Nordeste, notadamente nas regiões semiáridas, em que está concentrado 94% do rebanho caprino (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE, 2010).

Nos últimos anos, o mercado de leite de cabra no Brasil tem mostrado um grande crescimento. Alguns estados do Nordeste, têm investido em programas governamentais que têm contribuído para este aumento na produção e comercialização do leite de cabra, através de sua inserção no cardápio da merenda escolar (BANDEIRA et al., 2007). Tal situação tem incentivado a produção leiteira, contribuindo para uma maior geração de emprego e renda para a população.

A crescente disseminação do leite de cabra pode estar associada à sua elevada digestibilidade e por ser adequado ao consumo alternativo por pessoas que possuem intolerância ao leite bovino (MENDES et al., 2009). Seu consumo também tem aumentado pela procura por seus derivados, principalmente queijo e iogurte, fato que pode ser explicado pela presença de componentes importantíssimos à alimentação humana, como açúcar (Lactose), proteínas, gorduras, vitaminas, ferro, cálcio, fósforo e outros minerais (COSTA, 2008).

Devido ao aumento do consumo e da produção deste alimento, cuidados em relação a sua qualidade microbiológica são motivo de preocupação, tornando necessária a adoção de medidas para assegurar a saúde do consumidor (SILVA et al., 2015).

A riqueza de nutrientes do leite caprino fornece um excelente meio de cultura para o crescimento da maioria dos micro-organismos. Destarte, cuidados durante a manipulação e o processamento deste leite são importantes para evitar a perda de suas características físicas, químicas e nutricionais. Falhas em quaisquer das etapas de obtenção do leite caprino podem favorecer contaminações por patógenos, tornando-o veículo de diversas enfermidades para o homem (ALMEIDA; FRANCO, 2003).

3.3 *Staphylococcus aureus*

O gênero *Staphylococcus* pertence à família *Micrococcaceae*. São bactérias que se apresentam na forma de cocos Gram-positivos, agrupados em cachos, imóveis, capsulados e não esporulados. A maioria das espécies são aeróbicas ou anaeróbicas facultativas, com multiplicação rápida em meio de cultura a 37° C. São produtores de enzimas como a catalase; no entanto, existe uma enzima de extrema importância, denominada coagulase, que permite a distinção de *Staphylococcus aureus* (coagulase positiva) entre todas as restantes espécies do gênero *Staphylococcus* (coagulase negativa) (PLATA et al., 2009; LEVINSON, 2010).

Staphylococcus aureus destaca-se por ser o principal patógeno presente na microbiota de pessoas saudáveis, sendo responsável por causar sérias infecções aos mesmos (CAVALCANTI et al., 2006). Em todo o mundo, são relatados como os micro-organismos mais

envolvidos em infecções hospitalares e comunitárias (MOTOMEDI et al., 2010). Sua patogenia está associada a 3 fatores: a virulência mediada por suas toxinas, o seu caráter invasivo e seu perfil de resistência aos antibióticos (LE LOIR et al., 2003).

No Brasil, *Staphylococcus aureus* ocupou o 2º lugar entre os agentes etiológicos mais envolvidos em casos de surtos alimentares, segundo dados da Secretaria de Vigilância em Saúde no período de 2000 a 2011. A elevada contaminação de alimentos por esta espécie de micro-organismo indica falhas durante o processamento dos mesmos, principalmente nas operações de manipulação. Portanto, verifica-se a necessidade de maiores cuidados higiênicos sanitários durante a produção de alimentos destinados ao consumo (BORGES et al., 2008).

A faixa de temperatura para o crescimento de *S. aureus* varia de 7° C a 48,5° C, com temperatura ótima de 35 a 37° C, com tolerância a concentrações de 10% a 20% de NaCl e nitratos (HENNEKINNE et al., 2010). Exige valores de pH entre 4,0 e 9,8, sendo o pH ótimo para crescimento, compreendido entre 6,0 e 7,0. Estas características possibilitam *S. aureus* crescer numa grande variedade de alimentos (FRANCO; LANDGRAFF, 2000).

3.4 ENTEROTOXINAS ESTAFILOCÓCICAS

As toxinas bacterianas são classificadas como exotoxinas e endotoxinas (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008). As exotoxinas são proteínas ou enzimas produzidas no interior de algumas bactérias Gram-positivas, decorrentes da multiplicação e metabolismo dos micro-organismos, e liberadas na corrente sanguínea. Classicamente são agrupadas em três tipos, de acordo com seu modo de ação: citotoxinas, que destroem as células do hospedeiro ou afetam suas funções; neurotoxinas, que interferem com a transmissão normal de impulsos nervosos; e enterotoxinas, que afetam as células que revestem o trato gastrointestinal. As endotoxinas correspondem à porção externa da parede celular das bactérias Gram-negativas, que são liberadas após a morte bacteriana ou mesmo após a lise da parede celular (TORTORA et al., 2002).

As principais exotoxinas produzidas pelos estafilococos são as enterotoxinas termoestáveis e, por isso, capazes de resistir à temperatura de 100°C durante 30min (BERGDOLL, 1989). Essa propriedade torna a pasteurização e outros tratamentos térmicos convencionais eficazes na destruição dessas bactérias, mas não das enterotoxinas produzidas por elas (FURTADO et al., 2014).

No organismo humano, as enterotoxinas estafilocócicas (SE) conseguem resistir a ação de enzimas proteolíticas, fato que permite que permaneçam ativas no sistema digestivo mesmo após sua ingestão. Elas são definidas como proteínas extracelulares que apresentam baixo peso molecular, entre 22 a 29 kDa, e são hidrossolúveis (RAHIMI; FOROUGH, 2013).

Um fator limitante para produção dessas enterotoxinas por *S. aureus* está associado à concentração de micro-organismos existentes nos alimentos; quanto maior for essa concentração, maior será a competição microbiana e menor vai ser a taxa de multiplicação e capacidade de produção de toxinas (VERNOZY-ROZAND et al., 1996).

As enterotoxinas estafilocócicas são representadas seguindo a sequência alfabética e de acordo com a ordem das suas descobertas (SENGER; BIZANI, 2011). Dessa forma, foram primeiramente divididas em cinco principais tipos sorológicos (SEA, SEB, SEC, SED e SEE) que são responsáveis por quadros de intoxicações alimentares. Atualmente, já foram descritas além destas, outras 16 enterotoxinas (SEG-SEV) (ARGUDIN et al., 2010; OMOE et al., 2013).

De acordo com Zocche et al. (2009), os *S. aureus* podem apresentar, ao mesmo tempo, uma ou mais enterotoxinas. As enterotoxinas A, B, C, D e E são denominadas enterotoxinas clássicas, de maior ocorrência e associadas a 95% dos surtos. Dessa forma, buscou-se caracterizar as enterotoxinas mais comumente encontradas, baseando-se no trabalho de revisão realizado por Pinchuck et al. (2010) (Tabela 1).

Tabela 1 - Características das enterotoxinas estafilocócicas mais ocorrentes.

Genes	Enterotoxinas estafilocócicas	Características
<i>sea</i>	SEA	Toxina mais frequentemente associada com Intoxicação alimentar
<i>seb</i>	SEB	Estudada como arma biológica
<i>sec</i>	SEC	Isolada comumente de animais
<i>sed</i>	SED	Uma das mais identificadas em intoxicação alimentar, após a SEA
<i>see</i>	SEE	Intoxicação alimentar
<i>sef</i>	SEF	Associada a síndrome do choque tóxico
<i>seg</i>	SEG	Reduzido papel em intoxicação alimentar
<i>seh</i>	SEH	Intoxicação alimentar
<i>sei</i>	SEI	Reduzido papel em intoxicação alimentar

Adaptada de Pinchuck et al. (2010)

O papel das enterotoxinas clássicas como responsáveis por ocasionar intoxicações alimentares já é bem conhecido. Contudo, no que se refere às enterotoxinas posteriormente descritas, tais como SEG, SEH e SEI, ainda são poucos os estudos referentes (PINCHUK et al., 2010). Porém, trabalhos como o de Chen, Chiou e Tsen (2004) puderam constatar sua relação com intoxicações alimentares.

3.4.1. Características genéticas das toxinas produzidas por *S. aureus*

Em 1984 os genes responsáveis pela produção das enterotoxinas foram descritos. Isso foi possível a partir da clonagem da enterotoxina estafilocócica A (EEA) pela transferência do DNA cromossomal de um *S. aureus* enterotoxigênico em uma cepa de *Escherichia coli* (BETHEY et al., 1984). Os genes *sea* e *see* responsáveis pela produção das EEA e EEE, respectivamente, são carregados em prófagos, enquanto que os genes *sed* e *seg* que codificam as toxinas EED e EEG são de origem plasmidial. A EEG apresenta sequências similares com as sequências das EEA, EEE e EED. A amplificação por PCR do gene *seg* pode estar presente em todos os plasmídeos que codificam a EED (BALABAN; RASOOLY, 2000)

As EEC são um grupo de proteínas de origem cromossomal altamente conservadas e apresentam três subtipos distintos: EEC₁, EEC₂ e EEC₃, baseando-se nas diferenças dos determinantes antigênicos (MARRACK; KAPPLER, 1990). Outras variantes moleculares das EEC têm sido descritas de acordo com o hospedeiro animal a que estão relacionadas, EEC_{bovina}, EEC_{canina} e EEC_{ovina} (MARTIN et al., 2004)

O gene, *seb* responsável pela produção da EEB, pode ser de origem cromossomal (SHAFER; IANDOLO, 1978) ou pode ser carregado por plasmídeos (SHALITA et al., 1977). Em virtude da existência de sequências similares às das enterotoxinas clássicas (EEA-EEE), novos tipos de enterotoxinas foram descritas (OMOE et al., 2003).

A quantidade de enterotoxina expressa por cada classe de enterotoxina também difere. Bergdoll (1989) descreve que as EEB e EEC são expressas em maiores quantidades do que as outras enterotoxinas, frequentemente na ordem de 100 µg/ml de sobrenadante de cultura, enquanto que, a produção máxima obtida para EEA, EED e EEE é usualmente menor do que 10 µg/ml. Vários sistemas reguladores estão envolvidos na determinação da virulência de *S. aureus*, tais como os sistemas gene regulador acessório (*agr*), regulador acessório estafilocócico (*sar*) e diversos *sars* homólogos (GARVIS et al., 2002)

3.4.2 Intoxicação alimentar estafilocócica

Intoxicações alimentares são definidas por Franco e Landgraff (1996) como doenças de origem alimentar causadas pela ingestão de alimentos contendo toxinas microbianas previamente elaboradas durante a intensa proliferação de micro-organismos patogênicos. Neste grupo, enquadram-se *S. aureus*, *Clostridium botulinum* e *Bacillus cereus*. Segundo Baird-Parker (1990), desde 1930 têm-se demonstrado que *S. aureus* são comuns e largamente difundidos nas intoxicações alimentares.

Os *Staphylococcus* são responsáveis por contaminar alimentos que podem servir de veículos para a transmissão de doenças, devido a sua capacidade de produzir enterotoxinas (SE), levando a quadros de intoxicação alimentar. No homem, os *S. aureus* são os principais agentes etiológicos dessas intoxicações, caracterizadas por sintomas como: náuseas, vômito, cefaleia, cólicas abdominais, diarreia, sudorese e prostração (LAMAITA et al., 2005; BRASIL, 2010; OSTYN et al., 2010).

O período necessário para que a toxina estafilocócica se instale no organismo de um indivíduo, pode levar de 1 a 8 horas. A durabilidade da infecção pode ser de 1 a 3 dias, variando de acordo com a suscetibilidade do indivíduo, com o peso corporal e, principalmente, com o estado de saúde da pessoa acometida. Assim, crianças, idosos e pessoas imunossuprimidas são mais sensíveis a estas intoxicações alimentares (BORGES et al., 2008; BRASIL, 2010).

Em geral, as intoxicações são causadas quando tem uma quantidade mínima de enterotoxina estafilocócica no alimento. Para produção dessas enterotoxinas são necessárias condições adequadas de temperatura, pH, nutrientes e tempo suficiente para a multiplicação dos estafilococos, além da ingestão de alimentos com contagens de 10^5 UFC/g de toxina no alimento que seja capaz de originar os sintomas da doença (HENNEKINNE et al., 2010; COSTA; DIAS, 2013).

3.4.3 Síndrome do choque tóxico estafilocócico

A síndrome do choque tóxico foi descrita pela primeira vez em 1978; trata-se de uma enfermidade causada principalmente por cepas produtoras de TSST-1, que age no organismo humano como superantígeno (TODD et al., 1978; DEVRIES et al., 2011).

No que se refere à sua ação imunológica, as toxinas superantigênicas atuam na ativação e proliferação dos linfócitos T, que vão permitir a liberação de citocinas, interleucinas-1 e 2 e fator de necrose tumoral alfa e beta (PICKERING, et al., 2009). Esse mecanismo pode resultar

em manifestações clínicas potencialmente fatais, apresentando-se por meio de febre alta, hipotensão, exantema e falência de múltiplos órgãos (LAPPIN; FERGUSON, 2009).

A princípio, a síndrome do choque tóxico foi relacionada ao uso de tampões menstruais (VOSTRAL, 2011). Porém, nas últimas décadas a síndrome tem sido associada a casos de infecções cutâneas, abortos, uso de curativos contaminados, infecções pós-cirúrgicas dentre outras. Desse modo, a síndrome deixou de ser uma enfermidade associada apenas às mulheres, sendo os homens possíveis alvos (DINGES et al., 2000). No setor alimentício a toxina TSST-1 tem sido motivo de alerta, pois ela tem sido detectada em amostras de leite materno (NADER FILHO et al., 2007).

O tratamento é efetuado através do uso de antimicrobianos, sendo os antibióticos beta-lactâmicos como a oxacilina, os mais indicados devido sua ação bactericida. Geralmente, é realizado um suporte intensivo utilizando simultaneamente os antibióticos oxacilina e clidamicina que atua inibindo a síntese proteica (RUSSELL; PACHOREK, 2000; STEVENS et al., 2007). No entanto, é crescente a disseminação de isolados de *S.aureus* resistentes a oxacilina em hospitais e na comunidade, fato que compromete a terapia antimicrobiana dessa enfermidade (DURAND et al., 2006).

3.5 RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA

Desde o início da introdução de antibióticos na terapêutica clínica, verifica-se a presença de resistência antimicrobiana. Foi Alexander Fleming o primeiro a constatar a resistência natural dos micro-organismos aos antibióticos, por meio da observação de que as bactérias do grupo coli-tifoide não eram inibidas pela penicilina. Porém, a compreensão da causa dessa resistência foi alcançada por Abraham e Chain, que descobriram em culturas de *Escherichia coli* uma enzima capaz de bloquear a ação da penicilina, a esta enzima deram o nome de penicilinase (BUSH, 1989). A difusão do uso clínico da penicilina propiciou a observação de cepas resistentes a esse fármaco em nível mundial (MARTINS, 2012).

A resistência microbiana aos antibióticos pode ser definida como inata ou adquirida. A primeira está relacionada com a capacidade natural da bactéria em possuir na sua estrutura mecanismos que oferecem resistência a antibióticos, enquanto a segunda forma de resistência, como o próprio nome já diz, é adquirida através da exposição da bactéria ao antibiótico, tornando-a insensível ao mesmo, possivelmente após um tratamento errôneo (COYLE, 2005).

Existem inúmeras estratégias estabelecidas pelos micro-organismos que os tornam resistentes aos antimicrobianos, dentre elas: produção de enzimas que atuam destruindo o

antibiótico ou o modificando para que não seja reconhecido pelo alvo; alteração da permeabilidade da parede celular tornando-a impermeável ao antibiótico; bomba de efluxo; mutação dentre outros (COYLE, 2005).

Outra questão a ser discutida envolve a automedicação e o diagnóstico inadequado, que são atualmente os grandes inimigos da terapia antimicrobiana, pois possibilitam o desenvolvimento de micro-organismos resistentes (GANDRA et al., 2009).

Além disso, a resistência microbiana preocupa o setor alimentício, pois bactérias resistentes têm sido encontradas não raramente em alimentos (PALERMO NETO; ALMEIDA, 2006). Muitos estudos constataam que o uso de antimicrobianos em animais contribui para o surgimento de resistência à diversas classes de antimicrobianos em humanos, principalmente devido a transferência de bactérias resistentes através da cadeia alimentar (ARIAS; CARRILHO, 2012). No trato gastrointestinal, genes responsáveis pela resistência antimicrobiana podem ser transferidos a outras bactérias da mesma espécie ou de espécies diferentes, patogênicas ou não (WITTE, 2000; FOOD AND DRUG ASSOCIATION, 2002).

3.5.1 β - lactâmicos

Os beta-lactâmicos representam o grupo de antibióticos de maior importância clínica, principalmente devido a sua eficácia terapêutica e a sua baixa toxicidade para o homem e para os animais. Este grupo tem a capacidade de inibir a biossíntese do peptidoglicano, molécula tipicamente procariota. Em relação as células eucariotas, sua ausência confere-lhe uma toxicidade antibacteriana seletiva (AMADOR, 2010).

Estruturalmente todos os beta-lactâmicos são semelhantes, pois apresentam um anel beta-lactâmico característico, constituído por 3 átomos de carbono e um de nitrogênio diferenciando-se nos vários radicais substituintes (Figura 1) (SUAREZ; GUDIOL, 2009).

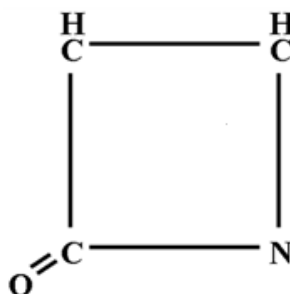


Figura 1 - Representação do anel beta-lactâmico presente em todo o grupo de antibióticos β -lactâmicos. (Disponível em <http://www.cram.com/flashcards/antibacs-i-anaerobes-opporinfections-3059782>)

Alguns inconvenientes estão associados ao uso dos beta-lactâmicos, pois os antibióticos pertencentes a este grupo podem ser inativados por hidrolases bacterianas, denominadas beta-lactamases. Devido ao conhecimento da existência de mais de 400 beta-lactamases, estudos têm desenvolvido novos antibióticos capazes de resistir à ação das mesmas. Contudo, já tem sido encontradas estirpes bacterianas resistentes aos novos beta-lactâmicos, bem como o surgimento de novos mecanismos de resistência. As bactérias possuem propriedades superiores às do homem em termos de plasticidade genética, fato que lhes permite romper as barreiras do efeito dos antibióticos (SOUSA, 2006; LI et al., 2007).

A família dos beta-lactâmicos é composta pelos seguintes grupos: carbapenemos, penicilinas, cefalosporinas e monobactams. Os grupos diferem no seu mecanismo de ação e na capacidade de resistência as beta-lactamases (SUAREZ; GUDIOL, 2009).

De acordo com Rivera-Tapia (2003) os antibióticos beta-lactâmicos estão associados a *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA), pois a detecção de MRSA dá-se pela avaliação do perfil de resistência aos beta-lactâmicos, além da detecção do gene *mecA* no DNA bacteriano.

3.5.2 *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA)

A princípio MRSA era detectado apenas em casos isolados; mas por volta de 1982, passaram a existir relatos de cepas epidêmicas que foram classificadas como multirresistentes, tornando-se amplamente difundidas pelo mundo, sendo causa conhecida de morbimortalidade (RANA; SHIRIVASTAVA, 2011).

Existem diversas formas pelas quais o homem pode contaminar-se com MRSA, seja através do emprego destes fármacos na pecuária, através do contato direto do homem com os animais, mas principalmente pelo consumo de alimentos de origem animal, contaminados com esses agentes patogênicos (COSTA, 2002).

De Boer et al (2009), encontrou em seus estudos linhagens de MRSA em diversos alimentos de origem animal, incluindo carne suína, frango, leite e derivados como o queijo bovino.

O tratamento de infecções estafilocócicas com meticilina ocorre de forma eficaz quando o antibiótico promove sua ligação a enzimas bacterianas constitutivas que participam da síntese da parede celular, também denominadas proteínas ligadoras de Penicilina (*Penicillin-Binding Protein* - PBP), impedindo o seu funcionamento correto. Porém, estirpes de MRSA vão apresentar o gene *mecA* que, juntamente com seus genes reguladores, estão presentes em um elemento genético móvel, denominado Cassete Cromossômico Estafilocócico *mec*

(SCCmec) que codifica uma proteína de ligação à penicilina modificada, chamada PBP2a ou PBP2'. Essa proteína possui baixa afinidade aos beta-lactâmicos (penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos e monobactâmicos) (MCCULLOCH, 2006)

4 REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, P. M. P.; FRANCO, R. M. Avaliação bacteriológica de queijo tipo minas frescal com pesquisa de patógenos importantes à saúde pública: *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* sp. e coliformes fecais. **Higiene Alimentar**, v.17, n.111, p.79-85, 2003.
- AHMADI, M.; ROHANI, S. M. R.; AYREMLOU, N. Detection of *Staphylococcus aureus* in milk by PCR. **Comparative Clinical Pathology**, v. 19, n. 1, p. 91-94, 2010.
- AMADOR, M. P. P. **Pesquisa e caracterização molecular de b-lactamases em bactérias isoladas de alimentos prontos-a-comer**. 2010. 241f. Tese (Doutorado em Engenharia Agro-industrial) – Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2010.
- ANDRADE, N. P. C. et al. Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos de *Staphylococcus* spp coagulase negativa de um rebanho leiteiro caprino em Santa Maria da Boa Vista – PE. **Medicina Veterinária**, v.6, p. 1-6, 2012.
- ARGUDIN, M. A.; MENDOZA, M. C.; RODICIO, M. R. Food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins. **Toxins (Basel)**, v. 2, p.1751–1773, 2010.
- ARIAS, M. V. B.; CARRILHO, C. M. D. M. Resistência antimicrobiana nos animais e no ser humano. Há motivo para preocupação? **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 2, p. 775-790, 2012.
- BAIRD-PARKER, A. C. The *Staphylococci*: an introduction. **Journal for Applied Bacteriology Symposium Supplement**, New York, p. 1S-8S, 1990.
- BALABAN, N.; RASOOLY, A. *Staphylococcal enterotoxins*. **International Journal of Food Microbiology**, v.61, p.1-10, 2000.
- BANDEIRA, D. A. et al. Características de produção da caprinocultura leiteira na região do cariri na Paraíba. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, Recife, v.10, n.1, p. 29-35, 2007.
- BERGDOLL, M. S. *Staphylococcus aureus*. In: **Food-borne bacterial pathogens**. New York: Marcel Dekker, 1989. p.463-523, 1989.
- BETLEY, M. J. et al. *Staphylococcal enterotoxin A gene is associated with a variable genetic element*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.81, p.5179-83, 1984.
- BORGES, M. F. et al. *Staphylococcus enterotoxigênicos em leite e produtos lácteos, suas enterotoxinas e genes associados: revisão*. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 26, n. 1, p. 70-86, 2008.
- BRASCA, M. et al. The influence of different cultural conditions on the development and toxinogenesis of *Staphylococcus aureus*. **Scienza Tecnica Lattiero-Casearia**, Parma, v. 56, p. 105-115, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual integrado de vigilância, prevenção e controle de doenças transmitidas por alimentos**. Brasília, DF, p.35-39, 2010.

BUSH, K. Characterization of β -lactamases. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 33, p. 259-276, 1989.

BUZBY, J. C; Roberts, T. The Economics of Enteric Infections: Human Foodborne Disease Costs. **Gastroenterology**, v. 136, p. 1851-62, 2009.

CAVALCANTI, S. M. M. et al. Comparative study on the prevalence of *Staphylococcus aureus* im ported to intensive care units of a university hospital, Pernam buco, Brazil. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 9, n. 4, p. 436-46, 2006.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, - CDC - Surveillance for Foodborne-isease Outbreaks - United States, 1998-2002. **Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR)**, November, 2006.

CHEN, T. R.; CHIOU, C. S.; TSEN, H. Y. Use of novel PCR primers specific to the genes of staphylococcal enterotoxin G, H, I for the survey of *Staphylococcus aureus* strains isolated from food-poisoning cases and food samples in Taiwan. **International Journal of Food Microbiology**, v. 92, n. 2, p. 189-197, 2004.

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

COSTA, P. M. R. M. Resistências antimicrobianas em avicultura. CONGRESSO DE CIÊNCIAS VETERINÁRIAS, Oeiras, p.251-60, 2002.

COSTA, R. G. Características químicas e sensoriais do leite de cabras Moxotó alimentadas com silagem de maniçoba. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.37, n.4, p.694-702, 2008.

COYLE, M. **Manual of Antimicrobial Susceptibility Testing**. American Society for Microbiology, 2005.

DE BOER, E. et al. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in meat. **International journal of food microbiology**, v. 134, n. (1-2), p. 52-6, 2009.

DEVRIES, A. S. et al. Staphylococcal toxic shock syndrome 2000-2006: epidemiology, clinical features, and molecular characteristics. **PLoS One**, v. 6, p. 22997, 2011.

DINGES, M. M.; ORWIN, P. M.; SCHLIEVERT, P. M. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. **Clinical Microbiology Reviews**, v.13, n.1, p.16-34, 2000.

DURAND, G. et al. Detection of new methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones containing the toxic shock syndrome toxin 1 gene responsible for hospital- and community-acquired infections in France. **Jornal of Clinical Microbiology**, v.44, p. 847-53, 2006.

FOOD and Drug Association.*Antimicrobial resistance: a growing threat.* Disponível em < www.fda.gov > Acesso dia 17 de setembro de 2002.

FORSYTHE, S. J. **Microbiology of Safe Food.** 2 ed. Oxford: Blackwell Publishing Ltd, 2010.

FRANCO, B. D. G. M; LANDGRAFF, M. **Microbiologia dos Alimentos.** São Paulo: Atheneu, 2000. 182 p.

FRANCO, B. D. G. M; LANDGRAFF, M. **Microbiologia dos Alimentos.** São Paulo: Atheneu, 1996.

FURTADO, R. et al. Enterotoxinas estafilocócicas em gêneros alimentícios. Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge. **Boletim Epidemiológico**, v. 13, 2014.

GANDRA, T. M. et al. Perfil de Resistência/Sensibilidade a antibióticos em cepas de *Estafilococos* coagulase positiva isoladas de embutidos e de queijos. **XI ENPOS I Mostra Científica**, Brasil, 2009.

GARVIS, S. et al. *Staphylococcus aureus* *svrA*: a gene requires for virulence and expression of the *agr* locus. **Microbiology**, v.148, p.3235-43, 2002.

GREIG, J. D.; RAVEL, A. Analysis of foodborne outbreak data reported internationally for source attribution, **International Journal of Food Microbiology**, v. 130, p. 77–87, 2009.

GREIG, J. D; LEE, M. B. Enteric outbreaks in long –term care facilities and recommendations for prevention: a review. **Epidemiology & Infection**, v. 137, p. 145–55, 2009.

HENNEKINNE, J. A. et al. How Should taphylococcal Food Poisoning Outbreaks BeCharacterized?. **Toxins**, v.2, p. 2106-2116, 2010.

HOLECKOVÁ, B. et al. Ocurrance of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in food. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, Lublin, n. 9, p. 179-182, 2002.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Censo Agropecuário**, 2010. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/>. Acesso em: 05/12/2012.

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

LAPPIN, E.; FERGUSON, A. J. Gram-positive toxic shock syndromes. **Lancet Infect Dis**, v. 9, p. 281-90, 2009.

LE LOIR, Y.; BARON, F.; GAUTIER, M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. **Genetics and Molecular Research**, v.2, p. 63e76, 2003.

LEVINSON, W. **Microbiologia Médica e Imunologia.** Ed Artmed, Porto Alegre, 2010, p. 113-118.

LI X.Z. et al. Adewoye L. β -lactam resistance and beta-lactamases in bacteria of animal origin. **Veterinary Microbiology**, v. 121(3/4), p.197-214, 2007.

MARRACK, P.; KAPPLER, J. The staphylococcal enterotoxins and their relatives. **Science**, v. 248, p.705-11, 1990.

MARTIN, M. C. et al. Genetic procedures for identification of enterotoxigenic strains of *Staphylococcus aureus* from three food poisoning outbreaks. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 94, p. 279-286, 2004.

MARTINS, P. D. **Análise da distribuição das espécies, da prevalência de genes de enterotoxinas e do perfil de resistência a antibióticos de isolados Estafilococos coagulase positiva de carne de frango resfriada e congelada. Porto Alegre – RS.** 2012. 81f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – UFRS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2012.

MCCULLOCH JA. **Avaliação da funcionalidade do locus *accessory gene regulator (agr)* em cepas de *Staphylococcus aureus* brasileiras com suscetibilidade reduzida aos glicopeptídeos.** São Paulo-SP. 2006. 108f. Tese (Programa de Pós-Graduação em Farmácia-Área de Análises Clínicas), Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP; 2006.

MENDES, C. G. M.; SILVA, J. B. A.; ABRANTES, M. R. Caracterização organoléptica, físico-química, e microbiológica do leite de cabra: uma revisão. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.3, n.1, p.5-12, 2009.

NADER FILHO, A. et al. Produção de enterotoxinas e da toxina da síndrome do choque tóxico por cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas na mastite bovina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, n.5, p.1316-8, 2007.

OMOE, K. et al. Identification and characterization of a new staphylococcal enterotoxin-related putative toxin encoded by two kinds of plasmids. **Infection and Immunity**, v.71, p.6088-94, 2003.

OMOE, K. et al. Emetic potentials of newly identified staphylococcal enterotoxin-like toxins. **Infection and Immunity**, v.81, p. 3627–3631, 2013.

OSTYN, A. et al. First evidence of a food poisoning outbreak due to staphylococcal enterotoxin type E, France, 2009. **Euro Surveil**, v.13, p.19528, 2009.

PALERMO NETO, J. P.; ALMEIDA, R. T. Antimicrobianos como Aditivos em Animais de Produção. In: SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária.** 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

PICKERING, L. K. et al. **Report of the Committee on Infectious Diseases.** American Academy of Pediatrics. Staphylococcal infections. 28. ed. Elk Grove Village, Red Book: 2009. p. 601-15.

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

PLATA, K.; ROSATO, A. E.; WEGRZYN, G. *Staphylococcus aureus* as an infectious agent: overview of biochemistry and molecular genetics of its pathogenicity (review). **Acta Biochimica Polonica**, v. 56, p. 597-612, 2009.

RAHIMI, E. E A; FOROUGH. Presence of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in cow, camel, sheep, goat, and buffalo bulk tank milk. **Veterinarski arhiv**, v.83, n.1, p. 23 – 30, 2013.

RANA, N.; SHRIVASTAVA, S. Comparative study of antimicrobial activity of different plants against multi drug resistant pathogen *Staphylococcus aureus* ATCC242 isolated from burnt patients and the effect of different binary combination of antimicrobial plant extracts. **International Journal of Food Safety**. v. 13, p. 88-92, 2011.

RIVERA-TAPIA JA. Antibiotic resistance, public health problem. **Anal Med Asociac Med Amer Brit Cowdray Hosp**. v.48, n.1, p.42-47, 2003.

RUSSELL, N. E.; PACHOREK, R. E. Clindamycin in the treatment of streptococcal and staphylococcal toxic shock syndromes. **Ann Pharmacother**, v.34, p.936-9, 2000.

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

SHALITA, Z.; HERTMAN, I.; SAND, S. Isolation and characterization of a plasmid involved with enterotoxin B production in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, v.129, p.317-25, 1997.

SILVA, JR, E. A. **Manual de Controle Higiênico - Sanitário em Serviços de Alimentação**. 6 ed. São Paulo: Ed Varela. 2008.

SILVA, L. C. A.; PESSOA, D. A. N.; SILVA, L. S. A. Aquino SS, Macêdo MMS, Mattos RAT, et al. Avaliação in vitro da sensibilidade de estirpes de *Staphylococcus* spp. isoladas de mastite caprina frente a desinfetantes comerciais. **Arquivo do Instituto Biológico**, v.82, p.1-4, 2015.

SOUSA, J.C. **Manual de Antibióticos Antibacterianos**. Edições Universidade Fernando Pessoa. Porto: Universidade Fernando Pessoa, 2006.

STEVENS, D. L. et al. E. Impact of antibiotics on expression of virulence-associated exotoxin genes in methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Infectious Diseases**, v.195, p.202-11, 2007.

SUAREZ, C.; GUDIOL, F. Beta-lactam antibiotics. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v.27, p.116-129, 2009.

TODD, J. et al. Toxic-shock syndrome associated with phage-group-I *Staphylococci*. **Lancet**, v. 2, p. 1116-8, 1978.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 6. ed. São Paulo: Artmed, 2002. 827 p.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**, São Paulo: Atheneu, 2008.

VERNOZY-ROZAND C. et al. Enterotoxin production by coagulase-negative staphhylococci isolated from goats milk and cheese. **International Jornal of Food Microbiology**. v.30, n. 3, p. 271-80, 1996.

VOSTRAL, S. L. Rely and Toxic Shock Syndrome: a technological health crisis. **Yale J Biol Med**, v. 84, p. 447-59, 2011.

WELKER, C. A. D. et al. Análise microbiológica dos alimentos envolvido sem surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) ocorridos no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**. v. 8, p. 44-8, 2010.

WITTE, W. Ecological impact of antibiotic use in animals on different complex microflora:environment. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v. 14, p. 321-325, 2000.

ZOCHE, F. et al. PCR multiplex para detecção de *Staphylococcus aureus* enterotoxigênicos isolados de alimentos de origem animal no sul do Rio Grande do Sul, Brasil. **Interciencia**, v. 34, n. 7, p. 487-491, 2009.

CAPÍTULO II

DETECÇÃO DE GENES ENTEROTOXIGÊNICOS E DO GENE *mecA* EM *Staphylococcus aureus* ISOLADOS DE LEITE CAPRINO

DETECÇÃO DE GENES ENTEROTOXIGÊNICOS E DO GENE *mecA* EM *Staphylococcus aureus* ISOLADOS DE LEITE CAPRINO

RESUMO: *Staphylococcus aureus* é motivo de preocupação para produtores de alimentos, pois são responsáveis por causar uma grande variedade de doenças no homem; dentre elas estão as doenças mediadas por toxinas, além da crescente resistência dos *S. aureus* a antibióticos. Diante disso, objetivou-se detectar a presença de genes enterotoxigênicos e do gene *mecA* em *S. aureus* isolados de leite caprino. Foram coletadas 49 amostras de leite caprino nas quais foi realizada a pesquisa de *S. aureus* e análise do perfil de resistência através da técnica difusão em discos em Agar Mueller-Hinton, utilizando os seguintes discos impregnados de antibióticos: sulfazotrim (25µg), vancomicina (30µg), tetraciclina (30µg), gentamicina (10µg), oxacilina (1µg), ciprofloxacina (5µg), eritromicina (15µg) e penicilina G (10µg). Seguiram-se a pesquisa dos genes de interesse utilizando a Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR). Os resultados da avaliação fenotípica do perfil de resistência dos *S. aureus* demonstraram uma maior resistência aos antibióticos penicilina G (87,75%) e oxacilina (75,51%). *S. aureus* foi identificado molecularmente pelo gene *16S rRNA*, havendo amplificação em 100% dos isolados. Foi verificado percentual de amplificação para os genes *sea*, *sec*, *sed*, *seg*, *seh*, *sei*, *sej* e *mecA*. O maior percentual de amplificação foi do gene *sej* (79,5%), seguido pelo gene *sei* (48,9%). O gene *mecA* foi detectado em 4,08% das amostras. Estes resultados sugerem que é de fundamental importância analisar a presença de enterotoxinas estafilocócicas em leite caprino, para proteger os consumidores de intoxicações alimentares e assegurar a saúde coletiva.

PALAVRAS-CHAVE: intoxicação alimentar, resistência, PCR.

ABSTRACT: *Staphylococcus aureus* is a concern to food producers, because it is responsible for causing a variety of illnesses in people; among which are the toxin-mediated diseases, and because there is an increasing resistance of *S. aureus* to antibiotics. Thus, we aimed to detect the presence of enterotoxigenic genes and the *mecA* gene in *S. aureus* isolated from goat milk. We collected 49 samples of goat milk in which we performed a *S. aureus* search and resistance profile analysis by the diffusion in disks technique in Mueller-Hinton Agar using disks impregnated with the following antibiotics: sulfamethoxazole-trimethoprim (25µg), vancomycin (30µg), tetracycline (30µg), gentamicin (10µg), oxacillin (1µg), ciprofloxacin (5µg), erythromycin (15µg) and penicillin G (10µg). Next, we searched the genes of interest to the study using the Polymerase Chain Reaction (PCR). Results from the phenotypic evaluation of the resistance profile of *S. aureus* showed increased resistance to the antibiotics penicillin G (87.75%) and oxacillin (75.51%). *S. aureus* was molecularly identified by the *16S rRNA* gene, with amplification in 100% of the strains isolated. We also verified the percentage of amplification for the *sea*, *sec*, *sed*, *seg*, *seh*, *sei*, *sej* and *mecA* genes. The highest percentage of amplification was of the *sej* gene (79.5%), followed by *sei* gene (48.9%). The *mecA* gene was detected in 4.08% of the samples. These results suggest that it is of fundamental importance to analyze the staphylococcal enterotoxins on goat milk, to protect consumers from food poisoning and to ensure public health.

KEYWORDS: food poisoning, resistance, PCR.

1 INTRODUÇÃO

Devido ao aumento do consumo e da produção do leite de cabra, cuidados em relação a sua qualidade microbiológica são motivo de preocupação, o que torna necessária a adoção de medidas que possam assegurar a saúde do consumidor (SILVA et al., 2015).

Um dos principais contaminantes do leite de cabra é o *Staphylococcus aureus*, que é frequentemente relatado como responsável por causar uma grande variedade de doenças no homem, dentre elas estão as doenças mediadas por toxinas: intoxicações alimentares e síndrome do choque tóxico estafilocócico (causada pela toxina 1 do choque tóxico estafilocócico - TSST-1) (XIE et al., 2011).

As enterotoxinas estafilocócicas são termoestáveis e, por isso, capazes de resistir a temperaturas de 100 °C durante 30 min. A pasteurização e outros tratamentos térmicos convencionais ao leite são eficazes na destruição dessas bactérias, mas não das enterotoxinas produzidas por elas (LE LOIR et al., 2003; BECKER et al., 2007).

Além das enterotoxinas clássicas (SEA-SEE), já foram descritas até o momento 16 novos tipos de enterotoxinas (SEG-SEV) (ARGUDIN et al., 2010; OMOE et al., 2013). Já a síndrome do choque tóxico estafilocócico é constantemente ocasionada por cepas produtoras da TSST-1 (LAPPIN e FERGUSON, 2009). Esta enfermidade ainda não foi associada ao consumo de alimentos, mas a detecção da toxina em alimentos pode indicar a possibilidade de transmissão para o homem (SENA, 2000).

A detecção destas enterotoxinas pode ser realizada por ELISA, imunodifusão, radioimunoensaio ou ainda aglutinação em látex. No entanto, testes comerciais ainda são limitados a detecção de enterotoxinas clássicas. Técnicas moleculares como a reação em cadeia pela polimerase (PCR) são capazes de identificar o agente etiológico e seus genes para toxinas antes da expressão das mesmas, embora sua utilização não seja disseminada (FOSHEIM et al., 2011).

Outro problema na contaminação por *S. aureus* em alimentos é o crescente surgimento de cepas resistentes à meticilina (MRSA), já que os mesmos são muitas vezes a única medida terapêutica existente. MRSA caracterizam-se como cepas que não respondem ao tratamento com β -lactâmicos e que apresentam o gene *mecA*, responsável pela codificação da proteína de ligação à penicilina (PBP2a). Esta proteína atua como um alvo resistente a inibição pelo antibiótico, impedindo a morte bacteriana (RIVERA-TAPIA, 2003). Baseado nisso, o objetivo do presente estudo foi verificar a prevalência de genes toxigênicos e do gene *mecA* em *S. aureus* isolados de leite caprino.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletadas 49 amostras de leite caprino, em recipientes estéreis, diretamente do produtor, na forma *in natura* e encaminhadas, sob refrigeração, ao laboratório para realização das análises microbiológicas.

2.1 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE *S. aureus*

Foram isolados em placas Petrifilm™, modelo Staph Express 3M. Em seguida, as colônias foram semeadas em caldo BHI e dispostas em estufa a 37 °C durante 24hrs. As colônias foram submetidas ao teste de coloração de Gram e às provas bioquímicas de identificação (catalase, coagulase e DNase) (ISO, 1999).

2.2 DETERMINAÇÃO FENOTÍPICA DO PERFIL DE RESISTÊNCIA DOS *S. aureus*

Uma suspensão bacteriana em caldo BHI foi padronizada de acordo com o tubo 0,5 da escala McFarland, correspondendo a aproximadamente 1×10^6 UFC/mL. O teste foi realizado em triplicata, através da técnica de difusão em discos em Agar Mueller-Hinton utilizando os seguintes discos impregnados de antibióticos: sulfazotrim (25µg), vancomicina (30µg), tetraciclina (30µg), gentamicina (10µg), oxacilina (1µg), ciprofloxacina (5µg), eritromicina (15µg) e penicilina G (10µg). O procedimento de leitura foi realizado medindo os halos de inibição formados ao redor dos discos com o auxílio de um paquímetro, após 24hrs de incubação a 37 °C; a leitura dos resultados foi realizada de acordo com a tabela de halos padronizada (CLSI, 2011).

2.3 TESTES MOLECULARES

Os pares de *primers* para amplificação dos genes selecionados estão expressos na Tabela 1.

2.3.1 Extração do DNA genômico

Foi realizada a extração do DNA bacteriano pelo método de fervura adaptado de Pacheco (1997). Colônias de *S. aureus* foram transferidas para tubos de eppendorf contendo 400 µl de TE (10 mM Tris-HCl, pH 8,0 e 1 mM EDTA, pH 8,0) e em seguida, incubadas em um termobloco sob agitação a 1400 rpm por 10 min à 100 °C. Logo após, centrifugou-se a 14000 xg à 24 °C por 10 minutos.

2.3.2 Amplificação por PCR do gene *16S rRNA*

Para confirmação de *S. aureus* todas as amostras foram avaliadas quanto a presença do gene *16S rRNA*, adaptado de Løvseth et al. (2004). As amplificações do DNA foram realizadas a partir de um volume de 25 µL. Nesta reação foi utilizado 12,5 µL de Go Taq® Green Master Mix da Promega, 1,25 µL de cada *primer*, 7,5 µL de água ultra pura e 2,5 µL de DNA das amostras.

2.3.3 Amplificação por PCR do gene *mecA*

A reação foi realizada com um volume de 25 µL, sendo 12,5 µL de Go Taq® Green Master Mix da Promega, 1,25 µL de cada *primer* descrito por Lee (2003), 7,5 µL de água ultra pura e 2,5 µL de DNA das amostras. As condições de amplificação seguiram as especificações de Dias et al. (2011). Como controle positivo foi utilizada a cepa padrão de *S. aureus* ATCC 33591, portadora do gene *mecA*; como controle negativo água ultrapura Milli-Q ao invés do DNA bacteriano (DIAS et al., 2011).

2.3.4 PCR Multiplex para detecção de genes enterotoxigênicos

Após a confirmação dos *S. aureus*, foram realizadas duas reações de PCR Multiplex objetivando detectar os genes: *sed*, *see*, *seg*, *sei* e *tsst* (MIX1) e *sea*, *seb-sec*, *sec*, *seh* e *sej* (MIX2). Um total de 5 pares de *primers* foram utilizados para cada uma das reações (Tabela 1). Os controles positivos para cada gene pesquisado foram: no MIX1 a cepa FRI472 como controle para detecção dos genes *sed*, *seg*, *sei* e *sej* e no MIX2 além da cepa FRI472, foi usada a MUSO como controle na detecção do gene *sea*. Como controle negativo do teste foi adotado água ultrapura Milli-Q ao invés do DNA bacteriano. O volume final da reação foi de 50 µL, sendo 25 µL de Go Taq® Green Master Mix da Promega, 1,5 µL de cada *primer*, 2,5 µL de MgCl₂, 6,5 µL de água ultra pura e 1,0 µL de DNA das amostras. O DNA foi amplificado em um termociclador Bio Rad T100 Thermal Cycler nas condições descritas por Løvseth et al. (2004).

2.3.5 Visualização dos produtos da PCR

Os fragmentos de DNA amplificados de todos os genes pesquisados, foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com GelRed™. Os fragmentos foram visualizados em um transluminador ultravioleta (UV), e o gel foi fotografado para análise.

Tabela 1- Iniciadores utilizados na PCR para identificação de genes enterotoxigênicos, gene *16S rRNA* e gene *mecA*, em *S. aureus* isolados de leite caprino.

Gene	Primer	Sequência de Nucleotídeo (5'-3')	Produto Amplificado (Pb)
<i>Sea</i>	GSEAR-1	GCA GGG AAC AGC TTT AGG C	521
	GSEAR-2	GTT CTG TAG AAG TAT GAA ACA CG	
<i>seb-sec</i>	GSEB-SECR-1	ACA TGT AAT TTT GAT ATT CGC ACT G	667
	GSEB-SECR-2	TGC AGG CAT CAT GTC ATA CCA	
<i>Sec</i>	GSECR-1	CTT GTA TGT ATG GAG GAA TAA CAA	284
	GSECR-2	TGC AGG CAT CAT ATC ATA CCA	
<i>Sed</i>	GSEDR-1	GTG GTG AAA TAG ATA GGA CTG	385
	GSEDR-2	ATA TGA AGG TGC TCT GTG G	
<i>See</i>	GSEER-1	TAC CAA TTA ACT TGT GGA TAG AC	171
	GSEER-2	CTC TTT GCA CCT TAC CGC	
<i>Seg</i>	GSEGR-1	CGT CTC CAC CTG TTG AAG G	328
	GSEGR-2	CCA AGT GAT TGT CTA TTG TCG	
<i>Seh</i>	GSEHR-1	CAA CTG CTG ATT TAG CTC AG	359
	GSEHR-2	GTC GAA TGA GTA ATC TCT AGG	
<i>Sei</i>	GSEIR-1	CAA CTC GAA TTT TCA ACA GGT ACC	466
	GSEIR-2	CAG GCA GTC CAT CTC CTG	
<i>Sej</i>	GSEJR-1	CAT CAG AAC TGT TGT TCC GCT AG	142
	GSEJR-2	CTG AAT TTT ACC ATC AAA GGT AC	
<i>Tsst</i>	GTSSTR-1	GCT TGC GAC AAC TGC TAC AG	559
	GTSSTR-2	TGG ATC CGT CAT TCA TTG TTA T	
<i>16S rRNA</i>	G16SRRNAR-1	GTA GGT GGC AAG CGT TAT CC	228
	G16SRRNAR-2	CGC ACA TCA GCG TCA G	
<i>mecA</i>	GMECAR-1	AGTTCTGCAGTACCGGATTTGC	533
	GMECAR-2	AAAATCGATGGTAAAGGTTGGC	

Fonte: Løvseth et al., 2004; Lee, 2003.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi verificada em todas as amostras de leite caprino a presença de isolados de *S. aureus*. Na avaliação fenotípica do perfil de resistência desses isolados, adotou-se os seguintes critérios de classificação: sensível (S), intermediário (I) ou resistente (R), de acordo com as definições pré-estabelecidas pelo CLSI (2011). Foi constatado que 89,79% dos isolados foram resistentes a pelo menos um antibiótico. Os maiores níveis de resistência encontrados foram para os antibióticos penicilina e oxacilina (Tabela 2).

Tabela 2 - Perfil de resistência e sensibilidade de *S. aureus* isolados de leite caprino a antibióticos.

ANTIBIÓTICOS	RESISTENTE		INTERMEDIÁRIO		SENSÍVEL	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Sulfazotrim	26	53,06	5	10,20	18	36,74
Vancomicina	23	46,93	0	0	26	53,06
Tetraciclina	27	55,10	2	4,08	20	40,81
Gentamicina	17	34,69	16	32,65	17	34,69
Oxacilina	37	75,51	0	0	12	24,49
Ciprofloxacina	4	8,16	20	40,81	25	51,03
Eritromicina	29	59,18	6	12,24	14	28,58
Penicilina G	43	87,75	0	0	6	12,25

Nº: números absolutos; %: valor percentual.

A elevada resistência à penicilina vem sendo observada nos últimos anos, fato que tem restringido seu uso para diversos tratamentos (GELATTI et al., 2009).

A oxacilina é um dos poucos antibióticos β -lactâmicos indicados para o tratamento de *S. aureus* produtores de TSST-1, porém tem se verificado constantemente resistência. Diante dessa realidade, é recomendada a utilização do antibiótico vancomicina; no entanto, casos de resistência a este antibiótico também têm sido relatados (STEVENS et al., 2007).

Este trabalho chama atenção para a resistência ao antibiótico vancomicina, pois nos últimos anos têm-se verificado de forma cada vez mais frequente, a emergência de *S. aureus* resistentes à vancomicina (VRSA). Visto que este grupo de antibióticos apresentava uma das últimas opções terapêuticas para doenças ocasionadas por *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA), torna-se necessário buscar outras alternativas para o tratamento de intoxicações estafilocócicas (OLIVEIRA et al., 2014).

Neste estudo, 73,46% dos isolados foram multirresistentes. De acordo com o Codex Alimentarius (2005), é considerada multirresistência de estafilococos quando o isolado é resistente a três ou mais antimicrobianos. O surgimento e a dispersão de bactérias multirresistentes prejudicam procedimentos clínicos e aumentam os custos do tratamento, além de elevarem as taxas de morbidade e mortalidade humana.

Song et al. (2015) também constatou a presença de resistência a oxacilina em *S. aureus* isolados de alimentos. Além disso, o uso indevido de antimicrobianos no combate a infecções humanas pode limitar o tratamento de intoxicações alimentares (ACCO et al., 2003).

Atualmente, a oxacilina é utilizada para avaliar a resistência à meticilina. Neste estudo *S.aureus* apresentou um grande percentual de resistência a este antibiótico e, portanto, fenotipicamente pode-se considerar tratar-se de MRSA; mas é a detecção do gene *mecA* que é considerada padrão ouro para a classificação (CLSI, 2011).

Foi encontrado um baixo índice de MRSA neste trabalho (4,08%). Dentre as duas amostras (4,08%) que apresentaram o gene *mecA*, uma delas (2,04%) apresentou também os genes enterotoxigênicos *sej* e *sei*. Resultado este que chama a atenção para a crescente resistência microbiana e como a ausência de um tratamento antimicrobiano adequado representa um risco para os casos de intoxicações alimentares.

Apesar do pequeno número de amostras de MRSA identificadas pela presença do gene *mecA* houve, no geral, grande resistência dos isolados aos antibióticos. Isso pode ser explicado pela existência de outros mecanismos não relacionados a este gene, como a superprodução de β -lactamases ou a produção de PBPs habituais, porém com graus variados de afinidade pelos β -lactâmicos (MÍMICA; MENDES, 2007).

A identificação do gene *16S rRNA* em associação com os resultados positivos das análises morfológicas e bioquímicas, classificou os isolados como sendo *S. aureus*. Os produtos de amplificação do gene *16S rRNA* podem ser visualizados na Figura 1.

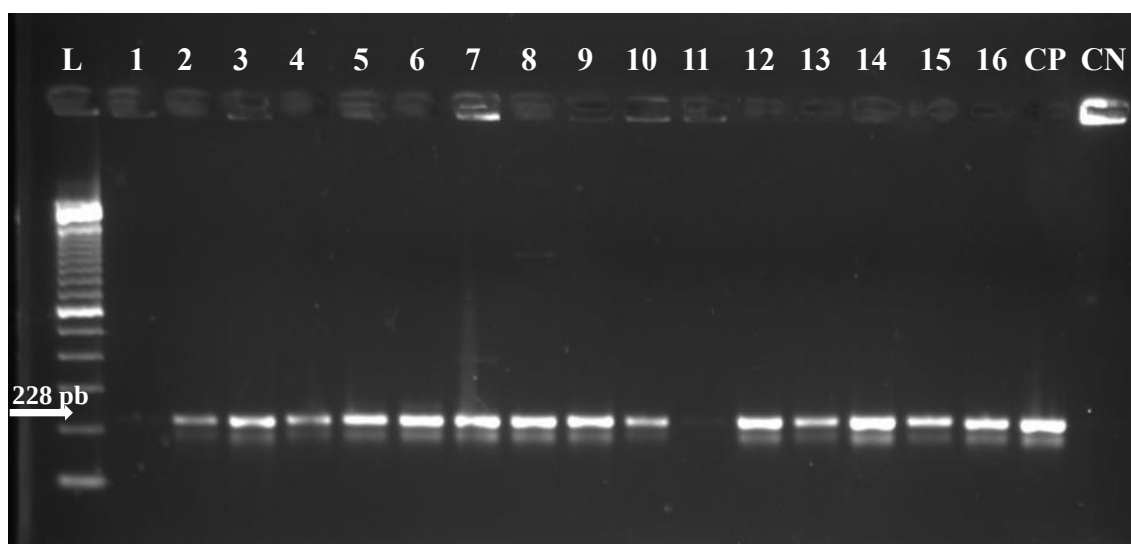


Figura 1 - Eletroforese em gel de agarose para pesquisa do gene *16S rRNA* (228 pb) pela técnica de PCR. L: Ladder 100pb; CP: Controle Positivo Cepa ATCC 33591; CN: Controle Negativo MIX ausente de DNA; Amostras positivas: 1 a 16.

Na Figura 2, pode ser verificado que 100% dos isolados foram confirmados para a espécie *S. aureus* através da amplificação do gene *16S rRNA*. Diversos genes são utilizados como sequência alvo para iniciadores específicos na identificação de *S. aureus*, os principais

são: *nuc*, *femA*, *16S rRNA*, *23S rRNA*, *Sa442*, entre outros. Todos esses genes possibilitam uma rápida identificação da espécie com alta sensibilidade e especificidade (PILLA et al., 2013).

O leite caprino analisado encontrava-se na forma *in natura*, e dessa maneira ausente de qualquer método de conservação. Fusco e Quero (2014) relataram em seus estudos que o leite cru é um reservatório potencial de *S. aureus*. Diante deste pressuposto, a contaminação por *S. aureus* pode ter sido proveniente de medidas higiênicas sanitárias inadequadas durante a manipulação ou ainda estar relacionada a enfermidades no rebanho caprino, como a mastite (LUINI et al., 2015).

Foi observada a presença de múltiplos genes enterotoxigênicos em alguns isolados de *S. aureus*. Verificou-se que em 10 (20,4%) dos isolados não houve amplificação dos genes enterotoxigênicos pesquisados. Porém, foi observada a presença de pelo menos dois genes codificadores de enterotoxinas em 16 (32,65%) dos isolados, de três genes em 12 (24,48%) e de quatro em 3 (6,12%).

Os genes das enterotoxinas clássicas tiveram um baixo índice de amplificação; dentre eles, o *sed* que codifica a enterotoxina SED, apresentou um maior percentual (22,4%) de amplificação. Nenhum isolado amplificou os genes *seb-sec*, *see* e *Tsst-1* (Figura 2).

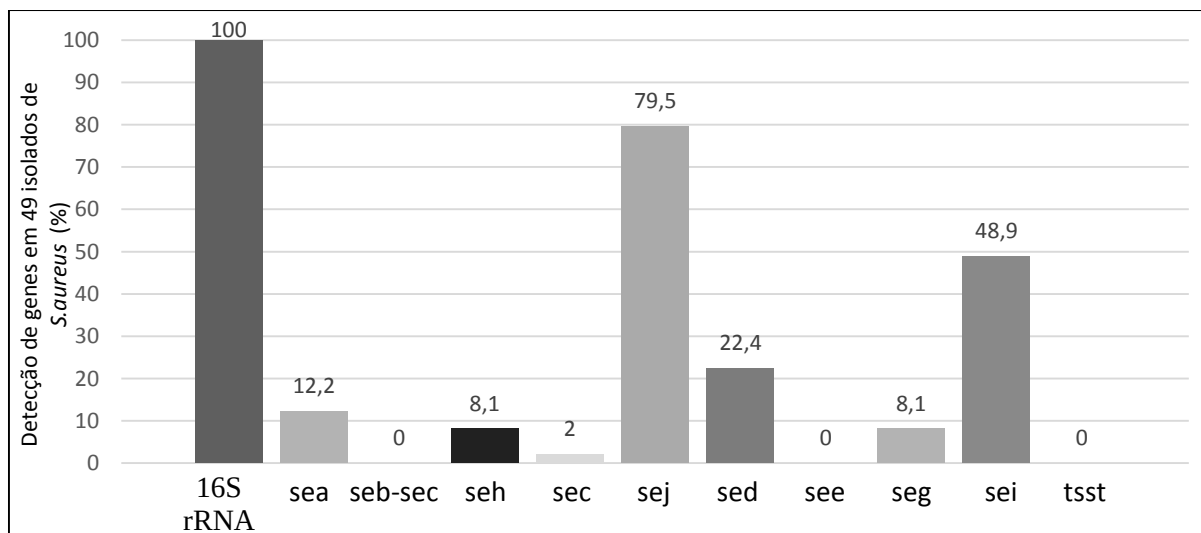


Figura 2 - Detecção de fragmentos de genes amplificados a partir de DNA genômico extraído de *S. aureus* isolados de leite caprino.

O leite coletado era destinado a industrialização e, portanto, ainda seria submetido a um processo de pasteurização. Mas de acordo com o alto índice de genes toxigênicos detectados, é provável que a adoção deste tipo de tratamento fosse ineficaz na destruição de possíveis toxinas existentes (LE LOIR et al., 2003; BECKER et al., 2007).

Os tipos clássicos de enterotoxinas, SEA, SEB, SEC_{1, 2, 3}, SED e SEE são considerados os de maior ocorrência (CLARISSE et al., 2013). Porém, nesse estudo genes para outras enterotoxinas foram mais presentes, apresentando uma maior porcentagem de amplificação para o gene *sej* (79,5%), seguido pelo gene *sei* (48,9%).

A elevada porcentagem encontrada na detecção dos genes *sej* e *sei* foi descrita anteriormente em outros alimentos lácteos, como em um estudo com amostras de queijo coalho, onde foram detectadas 25% de amostras amplificadas para o gene *sei* e 14% para o gene *sej* (FREITAS et al., 2009).

Trabalhos anteriores, como os realizados por Chen, Chiou e Tsen (2004), já vinham constatando a relação das toxinas não clássicas com doenças de origem alimentar, quando observaram que pacientes com toxinfecções não portavam enterotoxinas clássicas, mas apresentavam genes como *sei*, indicando que estes genes podem ocasionar surtos, porém ainda com pouca ocorrência.

Assim, o maior número encontrado de genes *sei* e *sej* neste estudo é motivo de alerta, pois para estes genes, apesar de já serem identificados há um bom tempo, sua relação com doenças alimentares, só recentemente, têm se mostrado mais incidente (AHMADY; KAZEMI, 2013; NAZARI et al., 2014).

4 CONCLUSÃO

A elevada multirresistência fenotípica encontrada em isolados de *S. aureus* indica que antibióticos de grande importância clínica estão com sua eficácia comprometida. Além de ter sido encontrado o gene *mecA* que caracteriza MRSA, a detecção de vários genes enterotoxigênicos indica que o leite caprino analisado pode representar um risco ao consumidor.

5 REFERÊNCIAS

- ACCO, M. et al. Identification of multiple strains of *Staphylococcus aureus* colonizing nasal mucosa of food handlers. **Food Microbiology**, v. 20, n. 5, p. 489-493, 2003.
- AMADY, M.; KAZEMI, S. Detection of the enterotoxigenic genes (*sei*, *sej*) in *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis milk in the West Azerbaijan of Iran. **Comparative Clinical Pathology**, v.22, p.649 -654, 2013.
- ARGUDIN, M. A.; MENDOZA, M. C.; RODICIO, M. R. Food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins. **Toxins (Basel)**, v. 2, p.1751–1773, 2010.

BECKER, H.; BÜRK, C.; MÄRTLBAUER, E. Staphylokokken-Enterotoxine: Bildung, Eigenschaften und Nachweis. **Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit**, v. 2, p. 171–189, 2007 [in German].

CHEN, T. R.; CHIOU, C. S.; TSEN, H. Y. Use of novel PCR primers specific to the genes of staphylococcal enterotoxin G, H, I for the survey of *Staphylococcus aureus* strains isolated from food-poisoning cases and food samples in Taiwan. **International Journal of Food Microbiology**, v. 92, n. 2, p. 189-197, 2004.

CLARISSE, T. et al. Detection and quantification of staphylococcal enterotoxin A in foods with specific and sensitive polyclonal antibodies. **Food Control**, v. 32 p. 255, 2013.

CLSI; Publication M100-S21. Suggested Grouping of US-FDA Approved Antimicrobial Agents That Should Be Considered for Routine Testing and Reporting on Nonfastidious Organisms by Clinical Laboratories, 2011.

CODEX ALIMENTARIUS. Code of practice to minimize and contain antimicrobial resistance. Roma, 2005.

DIAS, N. L. et al. Detecção dos genes de *Staphylococcus aureus*, enterotoxinas e de resistência à meticilina em leite. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.63, n.6, p.1547-1552, 2011.

FOSHEIM, G. E. et al. Multiplex real-time PCR assay for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and associated toxin genes. **Jornal of Clinical Microbiology**, v.49, p. 3071-3, 2011.

FREITAS, M. F. L. et al. Detecção de genes toxigênicos em amostras de *Staphylococcus* spp. isoladas de queijos de coalho. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n.2, p. 375-379, 2009.

FUSCO, V.; QUERO, G. M. Culture-dependent and culture-independent nucleic-acid-based methods used in the microbial safety assessment of milk and dairy products. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.13, p. 493e537, 2014.

GELATTI, L. C. et al. *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina: disseminação emergente na comunidade. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. v. 84, n.5, p.501-6, 2009.

ISO, 1999. ISO 6888-2: Microbiology of food and animal feeding stuffs—horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species)—Part 1: Technique using Baird-Parker agar médium, (Genève, Switzerland).

LAPPIN, E.; FERGUSON, A. J. Gram-positive toxic shock syndromes. **Lancet Infectious Diseases**, v.9, p.281-90, 2009.

LEE, J.H. Methicillin (Oxacillin)-Resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from major food animals and their potencial transmission to humans. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, p.6489-6494, 2003.

LE LOIR, Y.; BARON, F.; GAUTIER, M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. **Genetics and Molecular Research**, v.2, p.63e76, 2003.

LØVSETH, A.; LONCAREVIC, S.; BERDAL, K. G. Modified Multiplex PCR Method for Detection of Pyrogenic Exotoxin Genes in Staphylococcal Isolates. **Jornal of Clinical Microbiology**, v.42, n.8, p.3869–3872, 2004.

LUINI, M. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is associated with low within-herd prevalence of intra-mammary infections in dairy cows: Genotyping of isolates. **Veterinary Microbiology**, v.78, p. 270–274, 2015.

MÍMICA, M. J.; MENDES, C. M. F. Diagnóstico laboratorial da resistência à oxacilina em *Staphylococcus aureus*. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.43, n.6, p. 399-406, 2007.

NAZARI, R. et al. Enterotoxin gene profiles among *Staphylococcus aureus* isolated from raw milk. **Iranian Journal of Veterinary Research**, Shiraz University, v.15, n.4, p.409-412, 2014.

OLIVEIRA, C. F. et al. Emergência de *Staphylococcus aureus* resistentes aos antimicrobianos: um desafio contínuo. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v.13, n.2, p.242-7, 2014.

OMOE, K. et al. Detection of seg, seh and sei genes in *Staphylococcus aureus* isolates and determination of enterotoxin productivities of *S. aureus* isolates harboring seg, seh, or sei genes. **Jornal of Clinical Microbiology**, v. 40, p. 857–62, 2002.

OMOE, K. et al. Emetic potentials of newly identified staphylococcal enterotoxin-like toxins. **Infection and Immunity**, v.81, p.3627–3631, 2013.

PACHECO, A. B. Random amplification of polymorphic DNA reveals serotypespecific clonal clusters among enterotoxigenic *Escherichia coli* strains isolated from humans. **Jornal of Clinical Microbiology**, n. 35, v. 6, p. 1521-5, 1997.

PILLA, R. et al. Duplex real-time PCR assay for rapid identification of *Staphylococcus aureus* isolates from dairy cow milk. **Journal of Dairy Research**, v.5, n.2, p. 223-226, 2013.

RIVERA-TAPIA, J. A. Antibiotic resistance, public health problem. **Anal Med Asociac Med Amer Brit Cowdray Hosp**, v.48, n.1, p.42-47, 2003.

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, 2000.

SILVA, L.C.A. et al. Avaliação in vitro da sensibilidade de estirpes de *Staphylococcus* spp. isoladas de mastite caprina frente a desinfetantes comerciais. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 82, p. 1-4, 2015.

SONG, M. et al. Genetic diversity and virulence potential of *Staphylococcus aureus* isolates from raw and processed food commodities in Shanghai. **International Journal of Food Microbiology**, v. 195, p.1–8, 2015.

STEVENS, D. L. et al. Impact of antibiotics on expression of virulence-associated exotoxin genes in methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Jornal of Infectious Diseases**, v.195, p. 202-11, 2007.

XIE, Y. et al. Genotypes and toxin gene profiles of *Staphylococcus aureus* clinical isolates from China. **PLoS One** 6, p.28276, 2011.

APÊNDICE

ARTIGO SUBMETIDO - “DETECTION OF ENTEROTOXIGENIC GENES AND *mecA*
GENE IN *Staphylococcus aureus* ISOLATED FROM GOAT MILK”

Original do trabalho: Detecção de genes enterotoxigênicos e do gene *mecA*
em *Staphylococcus aureus* isolados de leite caprino.
Submetido para publicação na Revista Food Control.

Detection of enterotoxigenic genes and *mecA* gene in *Staphylococcus aureus*
isolated from goat milk

DETECTION OF ENTEROTOXIGENIC GENES AND *mecA* GENE IN *Staphylococcus aureus* ISOLATED FROM GOAT MILK

Germana Guimarães Rebouças ^{a*}, Maria Rociene Abrantes ^a, Gisele Oliveira de Souza ^b,
Manoela de Oliveira Rebouças ^a, Marcos Bryan Heinemann^b, Jean Berg Alves da Silva ^a

^a Laboratory of Inspection of Animal Products, Rural Federal University of the Semi-Arid, Av. Francisco Mota, 572, Mossoró, Rio Grande do Norte, Brazil.

^b Laboratory of Bacterial Zoonoses, Department of Preventive Veterinary Medicine and Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine and Zootechnics, University of Sao Paulo, USP.

*Corresponding author: UFERSA (Universidade Federal Rural do Semi-Árido), Av. Francisco Mota, 572, 59600-000, Mossoró, RN, Brazil. Tel. +55 84 3317 8360 Fax. +55 84 3317 8360
E-mail: ggreboucas@gmail.com (G.G. Rebouças)

Detection of enterotoxigenic genes and *mecA* gene in *Staphylococcus aureus* isolated from goat milk

Abstract

Staphylococcus aureus is a concern to food producers, because it is responsible for causing a variety of illnesses in people, among which are the toxin-mediated diseases, and because there is an increasing resistance of *S. aureus* to antibiotics. Thus, we aimed to detect the presence of enterotoxigenic genes and the *mecA* gene in *S. aureus* isolated from goat milk. We collected 49 samples of goat milk in which we performed a *S. aureus* search and resistance profile analysis by the diffusion in disks technique in Mueller-Hinton Agar using disks impregnated with the following antibiotics: sulfamethoxazole-trimethoprim (25µg), vancomycin (30µg), tetracycline (30µg), gentamicin (10µg), oxacillin (1µg), ciprofloxacin (5µg), erythromycin (15µg) and penicillin G (10µg). Next, we searched the genes of interest to the study using the Polymerase Chain Reaction (PCR). Results from the phenotypic evaluation of the resistance profile of *S. aureus* showed increased resistance to the antibiotics penicillin G (87.75%) and oxacillin (75.51%). *S. aureus* was molecularly identified by the *16S rRNA* gene, with amplification in 100% of the strains isolated. We also verified the percentage of amplification for the *sea*, *sec*, *sed*, *seg*, *seh*, *sei*, *sej* and *mecA* genes. The highest percentage of amplification was of the *sej* gene (79.5%), followed by *sei* gene (48.9%). The *mecA* gene was detected in 4.08% of the samples. These results suggest that it is of fundamental importance to analyze the staphylococcal enterotoxins on goat milk, to protect consumers from food poisoning and to ensure public health.

Keywords: food poisoning; molecular biology; resistance; PCR.

1. Introduction

Due to increased consumption and production of goat milk, some practices regarding their microbiological quality are worrying, this makes it necessary to adopt measures that can ensure consumer's health (Silva et al., 2015).

A major goat milk contaminant is *Staphylococcus aureus*, often reported as being responsible for causing a variety of diseases in people, among which are toxins-mediated diseases: food poisoning and toxic shock syndrome (caused by toxic shock syndrome toxin-1 – TSST-1) (Xie, 2011).

The staphylococcal enterotoxins are heat-stable and therefore able to withstand temperatures of 100°C for 30min. Pasteurization and other conventional heat treatments of milk are effective in destructing these bacteria, but not the enterotoxin produced by them (Le Loir et al. 2003; Becker et al., 2007).

In addition to the classic enterotoxins (SEA-SEE), 16 new types of enterotoxin have been described to date (SEG- SEV) (Argudin et al., 2010; Omoe et al., 2013), however the staphylococcal toxic shock syndrome is constantly caused by strains that produce TSST-1 (Lappin & Ferguson, 2009). This disease has not yet been associated with food intake, but the detection of these toxins in foods may indicate the possibility of transmission to people (Sena, 2000).

ELISA, immunodiffusion, radioimmunoassay or latex agglutination, can detect these enterotoxins. However, commercial tests are still limited to detecting classical enterotoxins. Although their use is not widespread, molecular techniques such as polymerase chain reaction (PCR) are able to identify the etiological agent of diseases and their toxins before they are expressed (Fosheim et al., 2011).

Another issue regarding contamination by *S. aureus* in food is the increasing emergence of strains resistant to methicillin (MRSA – Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*), which is often the only available therapeutic protocol. RSA

strains are characterized as unresponsive to treatment with β -lactams and they have the *mecA* gene which is responsible for encoding the penicillin-binding protein (PBP2a). This protein acts as a target resistant to inhibition by the antibiotic, preventing bacterial death (Rivera-Tapia, 2003). Based on this, the aim of this study was to determine the prevalence of toxigenic genes and the *mecA* gene in *S. aureus* isolated from goat milk.

2. Materials and methods

In total, we gathered 49 samples of goat milk in sterile containers, directly from the producer *in natura* and forwarded them under refrigeration to the laboratory to carry out microbiological analyses.

2.1 Isolation and identification of *S. aureus*

The bacteria were isolated from the samples in Petrifilm™ Plates, 3M Staph Express model. Then the colonies were inoculated on BHI broth and placed in an oven at 37°C for 24hrs. Later on, they underwent Gram staining and biochemical identification tests (catalase, coagulase and DNase) (ISO, 1999).

2.2 Phenotypic determination of *S. aureus* resistance profile

A bacterial suspension in agar BHI was standardized according to the 0.5 tube of the McFarland scale, corresponding to approximately 1×10^6 CFU/ml. The test was performed in triplicate, through the disk diffusion technique in Mueller-Hinton agar, using the following antibiotics impregnated in disks: sulfamethoxazole-trimethoprim (25 μ g), vancomycin (30 μ g), tetracycline (30 μ g), gentamicin (10 μ g), oxacillin (1 μ g), ciprofloxacin (5 μ g), erythromycin (15 μ g) and penicillin G (10 μ g). We gathered the results by measuring inhibition halos formed around the disk with the aid of a caliper,

after 24 hours of incubation at 37°C; we interpreted the results according to the standard halos table (CLSI, 2011).

Molecular tests. The pairs of primers for the selected genes amplification are described in Table 1.

2.3 Extraction of genomic DNA

Extraction of bacterial DNA was performed through the boiling method adapted from Pacheco (1997). We transferred *S. aureus* colonies to Eppendorf tubes containing 400 µl of TE (10 mM Tris-HCl, pH 8.0 and 1 mM EDTA, pH 8.0) next, incubated them in a thermoblock with stirring at 1400 rpm for 10 min at 100°C. Soon after, they were centrifuged at 14,000 xg at 24°C for 10 minutes.

2.4 PCR amplification of the *16S rRNA* gene

To confirm the presence of *S. aureus* all samples underwent tests that searched for the *16S rRNA* gene, adapted from Løvseth et al. (2004). The DNA amplifications were performed from a volume of 25 µL. For this reaction we used 12.5 µL of Go Taq® Green Master Mix from Promega, 1.25 µL of each primer, 7.5 µL of ultra-pure water and 2.5 µL of DNA from the samples.

2.5 PCR amplification of the *mecA* gene

The reaction was performed with total volume of 25 µL, 12.5 µL of Go and Taq® Green Master Mix from Promega, 1.25 µL of each primer described by Lee (2003), 7.5 µL of ultra-pure water and 2.5 µL of DNA from the samples. Amplification conditions followed the specifications of Dias et al. (2011). As a positive control we used the

standard strain of *S. aureus* ATCC 33591 carrying the *mecA* gene and as negative control ultra-pure water Milli-Q instead of bacterial DNA (Dias et al., 2011).

2.6 Multiplex PCR for the detection of enterotoxigenic genes

After confirmation of *S. aureus* presence, we performed two Multiplex PCR's with the intent to detect the following genes: *sed*, *see*, *seg*, *sei* and *tsst* (MIX1) and *sea*, *seb-sec*, *sec*, *seh* and *sej* (MIX2). Five pairs of primers were used for each of the reactions (Table 1). Positive controls for each gene studied were: in MIX1 the FRI472 strain was a control for the detection of the *sed*, *seg*, *sei* and *sej* genes and in MIX2 in addition to the FRI472 strain, we used MUSO as a control in detecting the gene *sea*. For the negative control of the test we used Milli-Q ultra-pure water instead of the bacterial DNA. The final reaction volume was 50µL, of those, 25µL were of Go Taq® Green Master Mix from Promega, 1.5µL of each primer, 2.5µL MgCl₂, 6.5µL of ultra-pure water, and 1.0 µL of DNA from the samples. We amplified the DNA in a thermocycler Bio Rad T100 Thermal Cycler under the conditions described by Løvseth et al. (2004).

2.7 Visualization of the PCR products

The amplified DNA of all the genes studied underwent electrophoresis in 1.5% agarose gel stained with GelRed™, the fragments were observed in an ultraviolet transilluminator (UV) and photographed for analysis.

3. Results

We observed in all samples from goat milk the presence of *S. aureus*. In the phenotypic analysis of the resistance profile of these bacterial strains isolated, we adopted the following criteria for classification: sensitive (S), intermediate (I) or resistant (R),

according to definitions pre-established by CLSI (2011). Analyzing the resistance profile, we found that 89.79% of the strains isolated were resistant to at least one antibiotic. The highest levels of resistance were against penicillin and oxacillin, shown in Table 2.

Few MRSA were found in this study (4.08%). Between the two samples (4.08%) that had the *mecA* gene, one (2.04%) also presented the enterotoxigenic genes *sej* and *sei*. This result points to the fact that there is increasing microbial resistance and absence of appropriate antimicrobial treatment is a risk for the cases of food poisoning.

The *16S rRNA* gene identification, in association with the positive results from morphological and biochemical tests, classified the isolated strains as *S. aureus*. Amplicons from the *16S rRNA* gene can be viewed in Figure 1.

Multiple enterotoxigenic genes were found in the same isolated strain of *S. aureus*. In 10 (20.4%) of the isolated strains there was no amplification of the enterotoxigenic genes investigated. However, it was observed the presence of at least two genes encoding enterotoxins in 16 (32.65%) of the strains, of three genes in 12 (24.48%) cases and of four genes in 3 (6.12%) strains.

In Figure 2 we seen that 100% of the strains isolated were confirmed to be of the *aureus* species through the amplification of the *16S rRNA* gene.

4. Discussion

High resistance to penicillin has been observed in recent years, this has restricted its use for several treatments (Gelatti et al., 2009; Spanu et al., 2012.).

Oxacillin is one of the few β -lactam antibiotics suitable for the treatment of TSST-1 producing *S. aureus*, however there are reports on resistance constantly. Given this fact, it is recommended the use of vancomycin, although cases of resistance to this antibiotic have also been reported (Stevens et al. 2007).

149 This study draws attention to the resistance against vancomycin, because in recent
150 years there were increasingly frequent emergences of vancomycin-resistant *S. aureus*
151 (VRSA). Since this antibiotic was one of the last treatment options for diseases caused by
152 methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA), it becomes necessary to seek alternatives for the
153 treatment of staphylococcal toxin poisoning (Oliveira et al., 2014).

154 In this study, 73.46% of the bacterial isolates were multi-drug resistant. According
155 to the Codex Alimentarius (2005), multi-resistant staphylococcus are considered so when
156 the isolate is resistant to three or more antimicrobials. The emergence and dissipation of
157 multi-resistant bacteria impair clinical procedures and increase treatment costs, as well as
158 raising the rates of human morbidity and mortality.

159 Song et al. (2015) also found oxacillin resistance in *S. aureus* strains isolated from
160 food. Furthermore, the misuse of these antibiotics in the management of human infections
161 may limit the treatment of food poisoning (Acco et al., 2003).

162 Currently, oxacillin is used to evaluate the resistance to methicillin. The *S. aureus*
163 in this study showed high percentage of resistance to this antibiotic and therefore
164 phenotypically these strains that were isolated can be considered MRSA, but it is the
165 detection of the *mecA* gene the key standard for such classification (CLSI, 2011).

166 Although there is a small number of MRSA samples identified by the presence of
167 the *mecA* gene, in general, resistance against antibiotics occurred frequently, this could
168 be explained by the existence of other mechanisms against such drugs not related to this
169 gene. Such as the overproduction of β -lactamases or the production of normal PBPs, but
170 with varying degrees of affinity for β -lactams (Mímica & Mendes, 2007).

171 Several genes are used as target sequences to specific primers for the identification
172 of *S. aureus*, the main ones are: *nuc*, *femA*, *16S rRNA*, *23S rRNA*, *Sa442*, among others.

All these genes enable rapid identification of the species with high sensitivity and specificity (Pilla et al., 2013).

The goat milk analyzed was *in natura* and thus, absent from any conservation method. Fusco & Quero (2014) reported in their studies that raw milk is a potential reservoir for *S. aureus*. Given this assumption, contamination by *S. aureus* may have been due to inadequate sanitary hygienic conditions during handling of the raw material or diseases in the goat herd, such as mastitis (Luini et al., 2015).

The genes of classic enterotoxins had low amplification rates, among these *sed*, which encodes the enterotoxin SED, had the biggest percentage (22.4%) of the amplicons and no isolated strain amplified the genes *seb-sec*, *see* and TSST-1 (Figure 2).

The milk sampled for this study was primarily produced to be industrialized and therefore, would still undergo pasteurization. However, according to the high rates of enterotoxigenic genes detected, it is likely that the adoption of this type of treatment would be ineffective in the destruction of possible existing toxins (Le Loir et al. 2003; Becker et al., 2007).

The classic enterotoxins types SEA, SEB, SEC_{1, 2, 3}, SED and SEE are usually the most frequent (Clarisse et al., 2013). However, in this study other toxins were more detected than those were. The *sej* gene (79.5%), had the highest percentage of amplification, followed by the *sei* gene (48.9%).

The high percentage of detection of *sej* and *sei* genes has been described previously in other dairy foods, such as a study with coalho cheese samples where 25% of samples had the gene *sei* amplified and 14% the gene *sej* (Freitas et al., 2009).

Previous works, such as those conducted by Chen, Chiou and Tsen (2004), already associated the non-classical toxins to foodborne diseases, when they observed that patients with these food poisonings did not carried classic enterotoxins, but presented

genes such as *sei*, which indicates that these genes can cause outbreaks, even though their occurrence is still small.

Therefore, the large number of *sei* and *sej* genes found in this study is cause for alert, because despite being known for a long time, these genes' relationship with foodborne diseases have only recently been further acknowledge (Ahmady & Kazemi, 2013; Nazari et al., 2014).

5. Conclusion

The high phenotypic resistance found in this study indicates that antibiotics of great clinical importance have had their effectiveness compromised. In addition to finding the *mecA* gene, which characterized MRSA, we detected many enterotoxigenic genes and this indicates that the analyzed goat milk can pose a risk to the consumer's health.

6. References

- Acco, M., Ferreira, F. S., Henriques, J. A. P. & Tondo, E. C. (2003). Identification of multiple strains of *Staphylococcus aureus* colonizing nasal mucosa of food handlers. *Food Microbiology*, 20, 489-493.
- Argudin, M. A., Mendoza, M. C. & Rodicio, M. R. (2010). Food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins. *Toxins (Basel)*, 2, 1751–1773.
- Becker, H., Bürk, C. & Märklbauer, E. (2007). Staphylokokken-Enterotoxine: Bildung, Eigenschaften und Nachweis. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit* 2, 171–189.

- 223 Chen, T. R., Chiou, C. S. & Tsen, H. Y. (2004). Use of novel PCR primers specific to the
224 genes of staphylococcal enterotoxin G, H, I for the survey of *Staphylococcus aureus*
225 strains isolated from food-poisoning cases and food samples in Taiwan. *International*
226 *Journal of Food Microbiology*, 92, 189-197.
- 227
- 228 Clarisse, T., Michele, S., Olivier, T., Valérie, E., Vincent, L. M., Jacques-Antoine, H.,
229 Michel, G. & Florence, V. (2013). Detection and quantification of staphylococcal
230 enterotoxin A in foods with specific and sensitive polyclonal antibodies. *Food Control*
231 32, 255.
- 232
- 233 CLSI; Publication M100-S21. (2011). Suggested Grouping of US-FDA Approved
234 Antimicrobial Agents That Should Be Considered for Routine Testing and Reporting on
235 Nonfastidious Organisms by Clinical Laboratories.
- 236
- 237 CODEX ALIMENTARIUS. (2005). Code of practice to minimize and contain
238 antimicrobial resistance.
- 239
- 240 Dias, N. L., Silva, D. C. B., Oliveira, D. C. B. S., Fonseca Junior, A. A., Sales, M. L. &
241 Silva, N. (2011). Detecção dos genes de *Staphylococcus aureus*, enterotoxinas e de
242 resistência à meticilina em leite. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecna*,
243 63, 1547-1552.
- 244
- 245 Fosheim, G. E., Nicholson, A. C., Albrecht, V. S. & Limbago, B. M. (2011). Multiplex
246 real-time PCR assay for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and
247 associated toxin genes. *Journal of Clinical Microbiology*, 49, 3071-3073.

- 248 Freitas, M. F. L., Luz, I. S., Pinheiro Júnior, J. W., Duarte, D. A. M., Vasconcelos, A. M.
249 M., Ribeiro, A. R., Mota, R. A., Balbino, T. C. L. & Stamford, T. L. M. (2009). Detecção
250 de genes toxigênicos em amostras de *Staphylococcus* spp. isoladas de queijos de coalho.
251 *Ciência e Tecnologia de Alimento*, 29, 375-379.
- 252
- 253 Fusco, V. & Quero, G. M. (2014). Culture-dependent and culture-independent nucleic-
254 acid-based methods used in the microbial safety assessment of milk and dairy products.
255 *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13, 493e537.
- 256
- 257 Gelatti, L. C., Bonamigo, R. R., Becker, A. P. & Azevedo, P. A. (2009). *Staphylococcus*
258 *aureus* resistentes à meticilina: disseminação emergente na comunidade. *Anais Brasileiro*
259 *de Dermatologia*. 84, 501-6.
- 260
- 261 ISO, (1999). ISO 6888-2: Microbiology of food and animal feeding stuffs—horizontal
262 method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (*Staphylococcus aureus*
263 and other species)—Part 1: Technique using Baird-Parker agar médium, (Genève,
264 Switzerland).
- 265
- 266 Lappin, E. & Ferguson, A. J. (2009). Gram-positive toxic shock syndromes. *Lancet Infect*
267 *Dis*. 9, 281-90.
- 268
- 269 Le Loir, Y., Baron, F. & Gautier, M. (2003). *Staphylococcus aureus* and food poisoning.
270 *Genetics and Molecular Research*, 2, 63-76.

- 271 Løvseth, A., Loncarevic, S. & Berdal, K. G. (2004). Modified Multiplex PCR Method for
272 Detection of Pyrogenic Exotoxin Genes in Staphylococcal Isolates. *Journal of Clinical*
273 *Microbiology*, 42, 3869–3872.
- 274
- 275 Luini, M., Cremonesi, P., Magro, G., Bianchini, V., Minozzi, G., Castiglioni, B. &
276 Piccinini, R. (2015). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is associated
277 with low within-herd prevalence of intra-mammary infections in dairy cows: Genotyping
278 of isolates. *Veterinary Microbiology*, 178, 270–274.
- 279
- 280 Mímica, M. J. & Mendes, C. M. F. (2007). Diagnóstico laboratorial da resistência à
281 oxacilina em *Staphylococcus aureus*. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina*
282 *Laboratorial*. 43, 399-406.
- 283
- 284 Oliveira, C. F., Morey, A. T., Biasi-Garbin, R. P., Perugini, M. R. E., Yamauchi, L. M.
285 & Yamada-Ogatta, S. F. (2014). Emergência de *Staphylococcus aureus* resistentes aos
286 antimicrobianos: um desafio contínuo. ***Revista de Ciências Médicas Biológicas***, 13, 242-
287 7.
- 288
- 289 Omoe, K., Hu, D. L., Ono, H. K., Shimizu, S., Takahashi-Omoe, H., Nakane, A.,
290 Uchiyama, T., Shinagawa, K., Imanishi, K. (2013). Emetic potentials of newly identified
291 staphylococcal enterotoxin-like toxins. *Infection and Immunity*, 81, 3627–3631.
- 292
- 293 Pacheco, A. B. (1997). Random amplification of polymorphic DNA reveals
294 serotypespecific clonal clusters among enterotoxigenic *Escherichia coli* strains isolated
295 from humans. *Journal of Clinical Microbiology*, 35, 1521-1525.

- 296 Pilla, R., Snel, G. G. M., Malvisi, M. & Piccinini, R. (2013). Duplex real-time PCR assay
297 for rapid identification of *Staphylococcus aureus* isolates from dairy cow milk. *Journal*
298 *of Dairy Research*, 5, 223-226.
- 299
- 300 Rivera-Tapia, J. A. (2003). Antibiotic resistance, public health problem. *Anal Med*
301 *Asociac Med Amer Brit Cowdray Hosp.* 48, 42-47.
- 302
- 303 Silva, L. C. A., Pessoa, D. A. N., Silva, L. S. A., Aquino, S. S., Macêdo, M. M. S., Mattos,
304 R. A. T. & Garino Junior, F. (2015). Avaliação in vitro da sensibilidade de estirpes de
305 *Staphylococcus* spp. isoladas de mastite caprina frente a desinfetantes
306 comerciais. ***Arquivo do Instituto Biológico*, 82, 1-4.**
- 307
- 308 Song, M., Bai, Y., Xu, J., Carter M.Q., Shi, C. & Shi, X. (2015). Genetic diversity and
309 virulence potential of *Staphylococcus aureus* isolates from raw and processed food
310 commodities in Shanghai. *International Journal of Food Microbiology*, 195, 1–8.
- 311
- 312 Stevens, D. L., Ma, Y., Salmi, D. B., McIndoo, E., Wallace, R. J. & Bryant, A. E. (2007).
313 Impact of antibiotics on expression of virulence-associated exotoxin genes in methicillin-
314 sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *The Journal of Infectious*
315 *Diseases*, 195, 202-211.
- 316
- 317 Xil, Y., He, Y., Gehring, A., Hu, Y., Li, Q., Tu, S. I., Shi, X. (2011). Genotypes and toxin
318 gene profiles of *Staphylococcus aureus* clinical isolates from China. *PLoS One*, 6, 1-11.

Table 1. Primers used in the PCR for the identification of enterotoxigenic genes, *16S rRNA* and *mecA*.

Gene	Primer	Nucleotide sequence (5'-3')	Amplified product (Pb)
<i>Sea</i>	GSEAR-1	GCA GGG AAC AGC TTT AGG C	521
	GSEAR-2	GTT CTG TAG AAG TAT GAA ACA CG	
<i>seb-sec</i>	GSEB-SECR-1	ACA TGT AAT TTT GAT ATT CGC ACT G	667
	GSEB-SECR-2	TGC AGG CAT CAT GTC ATA CCA	
<i>Sec</i>	GSECR-1	CTT GTA TGT ATG GAG GAA TAA CAA	284
	GSECR-2	TGC AGG CAT CAT ATC ATA CCA	
<i>Sed</i>	GSEDR-1	GTG GTG AAA TAG ATA GGA CTG	385
	GSEDR-2	ATA TGA AGG TGC TCT GTG G	
<i>See</i>	GSEER-1	TAC CAA TTA ACT TGT GGA TAG AC	171
	GSEER-2	CTC TTT GCA CCT TAC CGC	
<i>Seg</i>	GSEGR-1	CGT CTC CAC CTG TTG AAG G	328
	GSEGR-2	CCA AGT GAT TGT CTA TTG TCG	
<i>Seh</i>	GSEHR-1	CAA CTG CTG ATT TAG CTC AG	359
	GSEHR-2	GTC GAA TGA GTA ATC TCT AGG	
<i>Sei</i>	GSEIR-1	CAA CTC GAA TTT TCA ACA GGT ACC	466
	GSEIR-2	CAG GCA GTC CAT CTC CTG	
<i>Sej</i>	GSEJR-1	CAT CAG AAC TGT TGT TCC GCT AG	142
	GSEJR-2	CTG AAT TTT ACC ATC AAA GGT AC	
<i>Tsst</i>	GTSSTR-1	GCT TGC GAC AAC TGC TAC AG	559
	GTSSTR-2	TGG ATC CGT CAT TCA TTG TTA T	
<i>16S</i>	G16SRRNAR-1	GTA GGT GGC AAG CGT TAT CC	228
<i>rRNA</i>	G16SRRNAR-2	CGC ACA TCA GCG TCA G	
<i>mecA</i>	GMECAR-1	AGTTCTGCAGTACCGGATTTGC	533
	GMECAR-2	AAAATCGATGGTAAAGGTTGGC	

Source: Løvseth et al., 2004; Lee, 2003.

Table 2. Resistance and sensitivity profile of *S. aureus* isolated from goat milk.

ANTIBIOTICS	RESISTANT		INTERMEDIATE		SENSITIVE	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Sulfamethoxazole-trimethoprim	26	53,06	5	10,20	18	36,74
Vancomycin	23	46,93	0	0	26	53,06
Tetracyclin	27	55,10	2	4,08	20	40,81
Gentamicin	17	34,69	16	32,65	17	34,69
Oxacillin	37	75,51	0	0	12	24,49
Ciprofloxacin	4	8,16	20	40,81	25	51,03
Erythromycin	29	59,18	6	12,24	14	28,58
Penicillin G	43	87,75	0	0	6	12,25

Nº: absolut numbers; %: percentage.

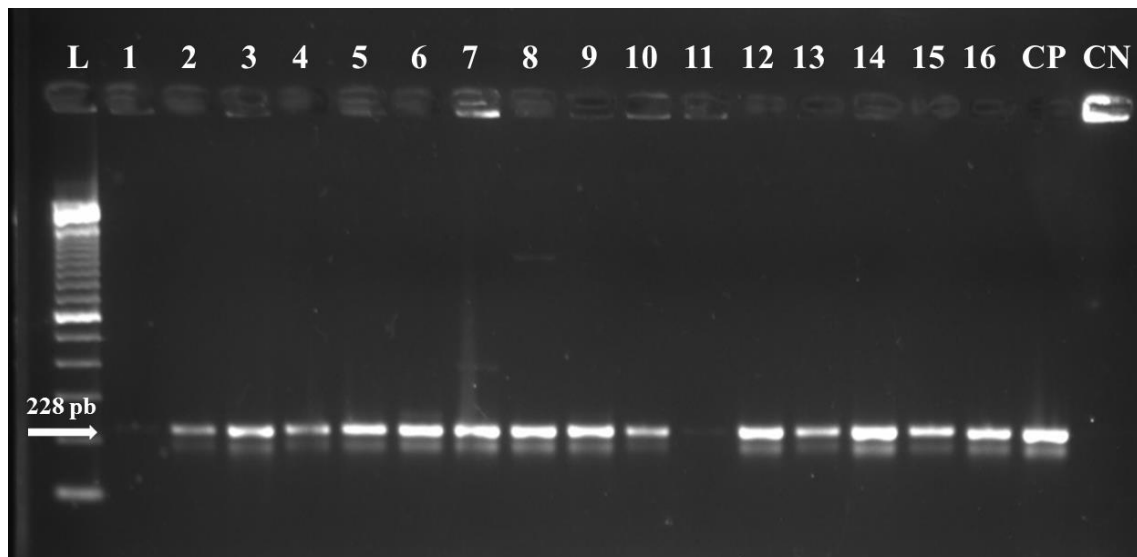


Figure 1. Agarose gel electrophoresis to search for the *16S rRNA* gene (228 bp) through PCR technique. L: Ladder 100pb; CP: Positive Control strain ATCC 33591; CN: Negative Control MIX DNA-free; Positive samples: 1 to 16.

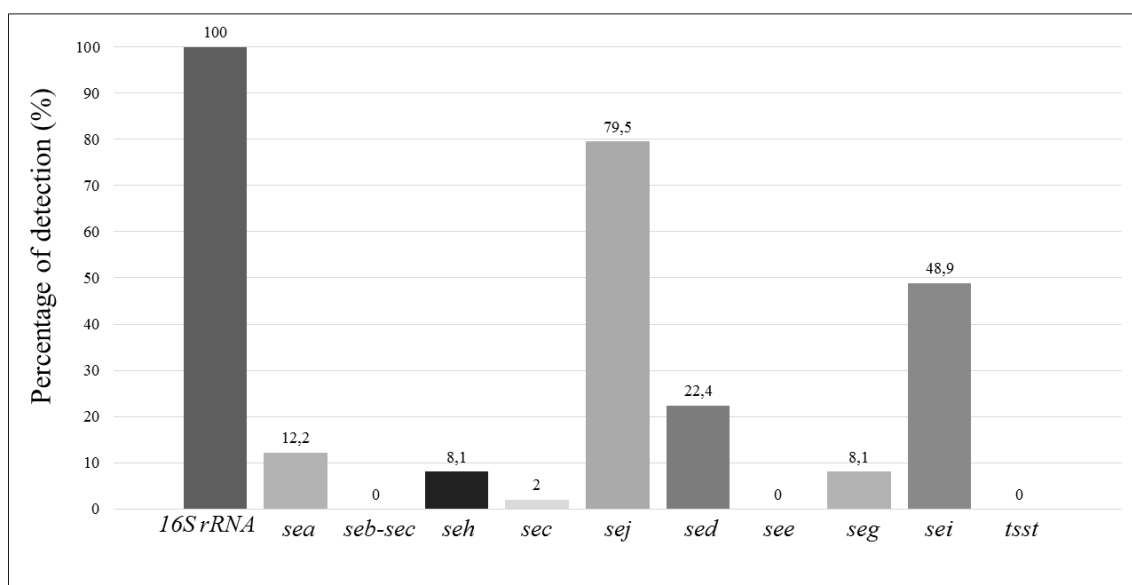


Figure 2. Frequency of amplification of gene fragments from *S. aureus* isolated from goat milk.