Universidade de São Paulo
Faculdade de Saúde Pública

**Caracterização genotípica de cepas de
Staphylococcus aureus recuperadas de alimentos ,
mãos de manipuladores de alimentos e veiculadas
por formigas**

Elaine Cristina de Mattos

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Saúde
Pública para obtenção do título de Mestre
em Saúde Pública

Área de concentração: Serviços de Saúde
Pública

Orientador: Prof. Dr. Pedro M. L. Germano

São Paulo
2005

Caracterização genotípica de cepas de *Staphylococcus aureus* recuperadas de alimentos , mãos de manipuladores de alimentos e veiculadas por formigas

Elaine Cristina de Mattos

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Saúde Pública
da Faculdade de Saúde Pública da
Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Mestre em Saúde Pública

Área de concentração: Serviços de Saúde Pública
Orientador: Prof. Dr. Pedro M. L. Germano

São Paulo

2005

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, por processos fotocopiadores.

Assinatura:

Data:

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Pedro M. L. Germano, pela orientação, dedicação e amizade, em todos os momentos;

À professora Dr^a Maria Helena Matté, pela paciência e pelo incentivo, diante das dificuldades;

À Dr^a Lúcia Baldassi pela colaboração e análise crítica do trabalho;

À professora Dr^a Maria Izabel Simões Germano, pelo apoio e amizade;

Às funcionárias do Laboratório de Saúde Pública do Departamento de Prática de Saúde Pública da USP, pelo suporte prestado;

Aos familiares, amigos e colegas de trabalho que, de alguma forma, colaboraram para a realização deste trabalho.

À minha mãe,

meu grande exemplo de sucesso,
pelo apoio, amizade, compreensão
e incentivo constante.

Ao Marcelo,

pelo amor, paciência,
companheirismo
e cumplicidade...

ÍNDICE

1. Introdução	1
1.1 Aspectos gerais	1
1.2 O gênero <i>Staphylococcus</i>	3
1.3 Reservatórios do <i>Staphylococcus</i> spp	6
1.4 Fatores de Virulência	7
1.5 Quadro clínico da toxinfecção estafilocócica	9
1.6 Epidemiologia	10
1.7 Alimentos envolvidos.....	12
1.8 Treinamento de manipuladores como base de prevenção	14
1.9 Diagnóstico	15
1.9.1 Métodos Convencionais	16
1.9.2 Métodos Moleculares	16
2. Objetivos	22
3. Material e Métodos	23
3.1 Amostragem	23
3.2 Técnica de coleta das amostras obtidas dos manipuladores	23
3.3 Análises Microbiológica e Bioquímica	23
3.4 Estocagem das culturas	24
3.5 Extração do DNA genômico	24
3.6 Extração do DNA Plasmidial	25
3.7 Confirmação da espécie <i>aureus</i> por PCR	27
3.8 PCR para verificação da presença do gene codificador para enterotoxina SEA	28
3.9 ERIC-PCR	28
3.10 Aspectos Éticos	29
4. Resultados	30
4.1 Análises Microbiológica e Bioquímica	30
4.2 Confirmação da espécie <i>aureus</i> por PCR	31
4.3 Perfil Plasmidial	34
4.4 Identificação de gene para produção da enterotoxina A (SEA)	37

4.5 ERIC-PCR	39
5. Discussão	41
5.1 Análises microbiológica e bioquímica	41
5.2 Confirmação da espécie <i>aureus</i> por PCR	42
5.3 Perfil Plasmidial	44
5.4 Identificação de gene para produção da enterotoxina A (SEA)	45
5.5 Relação entre a presença de plasmídios e presença do gene <i>sea</i>	45
5.6 ERIC-PCR	46
6. Conclusões	48
7. Referências Bibliográficas	50

RESUMO

A intoxicação alimentar causada por toxinas de *Staphylococcus aureus* é uma das principais causas de Doenças Transmitidas por Alimentos, principalmente em locais onde se preparam grandes quantidades de refeições, sendo o homem considerado a principal fonte de contaminação dos alimentos por este patógeno, pois de 30 a 50 % das pessoas sadias são portadoras desse microrganismo. O presente trabalho teve como objetivo comparar geneticamente cepas de *S. aureus* isoladas das mãos de manipuladores de alimentos, com cepas da mesma bactéria, recuperadas de alimentos e veiculadas por formigas. As cepas recuperadas dos manipuladores foram obtidas a partir das mãos destes utilizando-se a técnica de suabe e as cepas recuperadas de alimentos e veiculadas por formigas pertenciam à coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular do Departamento de Prática de Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública da USP. Todas as amostras foram submetidas às técnicas de PCR para verificação da presença de plasmídios e do gene *sea*. As análises microbiológicas revelaram que 18,4% dos manipuladores albergavam *S. aureus* em suas mãos. A confirmação da espécie *aureus* por PCR revelou somente 15,4% das cepas recuperadas dos manipuladores e 62,5% e 100% das recuperadas de alimentos e veiculadas por formigas, respectivamente. O perfil plasmidial revelou a existência de 2 grupos de cepas com perfis semelhantes e a PCR para o gene *sea*, que codifica a produção da enterotoxina SEA, demonstrou sua presença em 78,6% das cepas. A caracterização das cepas por ERIC-PCR evidenciou que todas as cepas apresentaram uma porcentagem de semelhança maior que 84% e que, as cepas de maior similaridade, apresentaram cerca de 90% de semelhança. Conclui-se que é de extrema importância a confirmação da espécie por método molecular, uma vez que este apresenta maior especificidade e sensibilidade do que os métodos microbiológicos; cepas isoladas de manipuladores, alimentos e veiculadas por formigas apresentavam certas semelhanças em relação ao perfil plasmidial, entretanto, a presença de plasmídio não esteve ligada necessariamente à presença do gene *sea*, normalmente relacionados; a técnica de ERIC-PCR constitui ferramenta importante para caracterização genética de cepas e elucidação de surtos de DTAs.

PALAVRAS-CHAVES: *Staphylococcus aureus*, Manipuladores, PCR.

ABSTRACT

The food poisoning caused by toxins of *Staphylococcus aureus* is one of the main causes of illnesses transmitted by foods, mainly in places where there is prepare of great amounts of meals, since human being is considered the main source of contamination of foods for this microorganism, therefore of 30% to 50 % of the healthy people are *S. aureus* carriers. The present work had as objective to compare genetically strains of *S. aureus* isolated from hands of food handlers, with strains of the same bacteria, recovered from foods and carried by ants. Strains recovered from food handlers were obtained by technique of swab and strains recovered from foods and carried by ants belong to collection of cultures of the Laboratory of Microbiology and Molecular Biology of Department of Practical of Public Health of College of Public Health – USP. All strains were submitted to PCR for verification of the presence of plasmids and *sea* gene. The microbiological analyses had observed that 18,4% of the food handlers were *S. aureus* carriers. The confirmation of *aureus* species by PCR had shown only 15.4% of strais recovered from food handlers and 62.5% and 100% recovered from foods and propagated for ants, respectively. The plasmidial profile revealed presence of 2 groups of strains with similar profiles and PCR for verification of *sea* gene, that it codifies the production of SEA enterotoxin, demonstrated that 78,6% of strains were positive. The characterization of strains by ERIC-PCR revealed that all of them had similarity above 84% and, strains that were very similar, presented 90% of similarity. It is concluded that it's extremely important confirmation of species by molecular methods, since performed higher especificity and sensitivity than microbiological methods; strains isolated from food handlers, foods and carried by ants presented relative similarities in relation to the plasmidial profile, however, plasmid presence was not linked, necessarily, to presence of *sea* gene, normally related; ERIC-PCR is important tool to genetic differentiating strains and to solve outbreaks.

KEY-WORDS: *Staphylococcus aureus*, food handlers, PCR.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos Gerais

A saúde é um direito inalienável de todo cidadão, tal como está expresso na Declaração Universal dos Direitos do Homem, promulgada em 1948, pela Organização das Nações Unidas, mas para que haja saúde é fundamental que os alimentos sejam produzidos em quantidade e com qualidade apropriadas ao equilíbrio orgânico, o qual representa um fator de resistência às doenças (GERMANO & GERMANO 2003c).

As enfermidades de origem alimentar ocorrem quando uma pessoa contrai uma doença devido à ingestão de alimentos contaminados com microrganismos ou toxinas indesejáveis. Essa condição é denominada como toxinfecção alimentar. É sabido que apenas um pequeno número de casos de enfermidades causadas por alimentos é notificado aos órgãos de inspeção de alimentos, de controle e às agências de saúde. Isso se deve, em parte, ao fato de que muitos patógenos, presentes em alimentos causam sintomas brandos e a vítima não busca auxílio médico (FORSYTHE 2002a).

De acordo com os registros da Organização Mundial da Saúde (OMS), são detectados, anualmente, nos países em desenvolvimento, mais de um bilhão de casos de diarreia aguda em crianças menores de 5 anos, das quais cinco milhões chegam ao óbito. A contaminação bacteriana dos alimentos é uma das causas representativas destes casos (GERMANO & GERMANO 2003b).

MEAD e cols (1999) relataram que as principais doenças de origem alimentar causaram, por ano, aproximadamente 76 milhões de casos, 323 mil hospitalizações e 5 mil mortes nos Estados Unidos. Considerando uma população de 270 milhões e 299 mil pessoas (US Census Bureau, 1998), isso significa que a cada ano 28,0% da população sofre de toxinfecções causadas por alimentos com 0,1% de hospitalizações.

Em termos de Saúde Pública, há indicação que a ocorrência destas doenças vem aumentando, gradativamente, sendo responsável por centenas de mortes, milhares de hospitalizações e, possivelmente, complicações irreversíveis, cujos números são ainda desconhecidos (GERMANO & GERMANO 2003b).

Deve-se enfatizar a importância destes quadros em populações carentes e desnutridas, que vivem em condições higiênico-sanitárias precárias, as quais facilitam a contaminação dos alimentos. A desnutrição, associada ou não a uma doença transmitida por alimentos, diminui acentuadamente a qualidade de vida dos indivíduos (GERMANO & GERMANO 2003b).

Com o crescimento dos serviços de alimentação coletiva, observa-se que os alimentos ficaram mais expostos a uma série de riscos ou oportunidades de contaminação microbiana, associada a práticas incorretas de manipulação e processamento (ALMEIDA e cols 1995).

Tradicionalmente, as medidas de controle incluem a implementação de técnicas de lavagem das mãos, treinamento e conscientização dos profissionais envolvidos no preparo, armazenamento e distribuição de alimentos. Atualmente, a implantação das ferramentas de qualidade, como Plano 5 Sensos (5S), Procedimento Operacional Padrão de Sanitização (POPS), Boas Práticas de Fabricação (BPF) e Sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC), é primordial para a produção de alimentos seguros e para atingir a qualidade total.

A detecção e rápida correção das falhas no processamento dos alimentos, bem como, a adoção de medidas preventivas, constituem hoje a principal estratégia para o controle de qualidades desses produtos (ALMEIDA e cols 1995).

Em saúde pública, em particular na área de Vigilância Sanitária de Alimentos, o *S. aureus* é considerado como um dos mais frequentes causadores de surtos de toxinfecção, devido ao importante papel desempenhado pelos manipuladores, durante as diferentes etapas de processamento dos alimentos, somado aos riscos de contaminação das matérias-primas desde sua origem e às temperaturas inadequadas de conservação pós-cozimento (GERMANO & GERMANO 2003a).

As infecções intramamárias causadas por esta bactéria apresentam implicações importantes em saúde pública, tendo em vista que as toxinas podem ser excretadas no leite na evolução das infecções intramamárias dos rebanhos leiteiros e permanecer estáveis nos produtos oferecidos ao consumo. A simples presença de cepas toxigênicas de *S. aureus* no leite não implica, necessariamente, a ocorrência de intoxicações em seres humanos, porém o risco existe e é maior para crianças,

principalmente de tenra idade (GONZALEZ e cols 1988, SISCHO e cols 1993, BARKEMA e cols 1998, FAGUNDES & OLIVEIRA 2004).

Outra grande preocupação para a saúde pública em relação ao *S. aureus* é o aumento de cepas resistentes à meticilina (MRSA), antibiótico utilizado com frequência para o tratamento de infecções causadas por esta bactéria. A ocorrência de tais cepas tem sido relatada em diversos países, tais como Canadá, Estados Unidos, França, Suíça, Dinamarca, Finlândia e Brasil (COOMBS e cols 2004, WARREN e cols 2004, LOUREIRO e cols 2000).

1.2 O gênero *Staphylococcus*

As bactérias do gênero *Staphylococcus*, descritas pela primeira vez em 1879, são cocos Gram positivos com cerca de 1µm de diâmetro, caracteristicamente encontradas aos pares, pequenas cadeias ou em cachos similares aos de uvas (FORSYTHE 2002, CROSSLEY 1997, GERMANO & GERMANO 2003a). Possuem uma única parede celular de peptidoglicano, caracterizada por múltiplos resíduos de glicina com pontes de peptídeos, o que torna a bactéria sensível a lisostafina (CROSSLEY 1997).

Inclui mais de 30 espécies sendo que as espécies de interesse para a área de alimentos estão listadas no Quadro 1. É dividido em dois grupos de acordo com o teste da coagulase (teste baseado na habilidade de coagular plasma). A maior parte das cepas causadoras de intoxicação alimentar estafilocócica pertence à espécie *S. aureus* (coagulase positiva), embora algumas espécies coagulase negativas também tenham sido relatadas como responsáveis por tais intoxicações e por este motivo os estafilococos coagulase negativa não devem ser ignorados, especialmente se forem encontrados em grande número no alimento, indicando precárias práticas de higiene por parte dos manipuladores (JAY 2000).

São anaeróbios facultativos, capazes de produzir energia (ATP) pelas vias respiratória e fermentativa (CROSSLEY 1997). Embora sejam mesófilos, algumas cepas de *Staphylococcus*, especialmente *S. aureus*, podem crescer em temperaturas abaixo de 6,7°C. Em geral, o crescimento ocorre entre 7°C e 48°C, sendo 37°C a temperatura ótima para desenvolvimento. A enterotoxina é produzida entre 10°C e

48°C, contudo a faixa de 40°C a 45°C é considerada ótima para a sua produção (JAY 2000, GERMANO & GERMANO 2003a).

As faixas de pH e atividade de água (aw) suportadas pela bactéria são muito amplas, o mesmo sucedendo para a produção de toxina, apesar de seus limites serem, ligeiramente, inferiores, o pH situa-se entre 4,0 e 10,0, sendo 7,0 seu valor ótimo, enquanto a aw entre 0,83 e 0,99 ou superior. Deve-se destacar que estes valores variam de acordo com os substratos e a quantidade de oxigênio do meio (JAY 2000, GERMANO & GERMANO 2003a).

Quadro 1 – Espécies e subespécies de *Staphylococcus* conhecidas por produzirem coagulase, nuclease e/ou enterotoxinas.

Organismo	Coagulase	Nuclease	Enterotoxina	Hemolisina	Manitol
<i>S. aureus</i> subsp					
<i>anaerobius</i>	+	TS	-	+	-
<i>aureus</i>	+	TS	+	+	+
<i>S. intermedius</i>	+	TS	+	+	(+)
<i>S. hyicus</i>	(+)	TS	+	-	-
<i>S. delphini</i>	+	-		+	+
<i>S. schleiferi</i> subsp					
<i>coagulans</i>	+	TS		(+)	(+)
<i>schleiferi</i>	-	TS		-	-
<i>S. caprae</i>	-	TL	+	-	-
<i>S. chromogens</i>	-	-w	+	v	v
<i>S. cohnii</i>	-	-	+	v	v
<i>S. epidermidis</i>	-	-	+	-	-
<i>S. haemolyticus</i>	-	TL	+	v	v
<i>S. lentus</i>	-		+	+	+
<i>S. saprophyticus</i>	-	-	+	+	+
<i>S. sciuri</i>	-		+	+	+
<i>S. simulans</i>	-	V		+	+
<i>S. warneri</i>	-	TL	+	+	+
<i>S. xylosus</i>	-	-	+	v	v

Legenda: + positivo; - negativo; -w negativo ou fracamente positivo; (+) reação fraca; v variável; TS termooestável; TL termolábil

Fonte: CROSSLEY 1997

Muitas espécies apresentam necessidades nutricionais complexas, requerendo normalmente muitos aminoácidos, como fontes de nitrogênio e vitamina B. São catalase positiva, geralmente oxidase negativa e tolerantes a altas concentrações de NaCl, uma vez que algumas cepas crescem em concentrações de 7,0 – 10,0% e até mesmo 20,0% de NaCl. A concentração máxima de NaCl que permite o crescimento

depende de outros parâmetros, tais como temperatura, pH, aw e potencial de óxido-redução (Eh) (CROSSLEY 1997, JAY 2000, FORSYTHE 2002b). As características do crescimento de *S. aureus* e da produção de toxinas encontram-se no Quadro 2.

Quadro 2 – Condições para o crescimento de *S. aureus* e produção de toxinas

Parâmetro	Crescimento	Produção de toxinas
Temperatura (°C)	7 - 48	10 – 48
pH	4 - 10	4,5 – 9,6
Atividade de água	0,83 – 0,99	0,87 – 0,99

Fonte: FORSYTHE 2002

1.3 Reservatórios do *Staphylococcus* spp

Os estafilococos existem no ar, na poeira, no esgoto, na água, no solo, em moluscos, nos insetos, nas plantas e em áreas freqüentadas por mamíferos e pássaros (FORSYTHE 2002b, CROSSLEY 1997).

Os seres humanos e os animais constituem seus principais reservatórios. Estima-se que de 20,0% até 60,0% da população humana possa ser portadora de *S. aureus* sem apresentar qualquer tipo de doença (FORSYTHE 2002b, GERMANO & GERMANO 2003a).

As bactérias do gênero *Staphylococcus* são o maior grupo de bactérias presente na pele, glândulas e membranas mucosas dos mamíferos. A espécie *S. epidermidis* é amplamente encontrada em todo o tecido cutâneo (CROSSLEY 1997). A espécie *S. cohnii* é encontrada na pele humana e, ocasionalmente, no trato urinário e em feridas infectadas. A pele humana também é o habitat para *S. haemolyticus*, espécie que pode estar associada a infecções humanas. *S. hyicus* é encontrada na pele de suínos, onde ocasionalmente causa lesões, e tem sido encontrada no leite e em produtos cárneos suínos. A pele de alguns primatas e outros mamíferos é o habitat de *S. xylosus* enquanto a pele humana e a de outros primatas é o habitat de *S. simulans*. *S. schleiferi* subsp. *scheiferi* foi encontrada em amostras clínicas de pacientes com baixa resistência à infecção, enquanto a subsp. *coagulans* foi isolada de ouvidos infectados de cães. *S. aureus* subsp. *anaerobius* causa doença em ovelhas e *S. delphini* foi recuperada de golfinhos. *S. sciuri* é encontrada na pele de roedores e

S. lentus e *S. caprae* estão associadas aos caprinos, encontradas especialmente no leite (JAY 2000).

1.4 Fatores de Virulência

Os estafilococos não são produtores de esporos, entretanto, têm sido responsáveis por diversas infecções: endocardite, osteomielite, de feridas, síndrome do choque tóxico, hospitalares, entre outras, além da intoxicação de origem alimentar.

Cerca de 34 diferentes tipos de proteínas extracelulares podem ser produzidas por estafilococos e muitas delas estão envolvidas ou contribuem para o processo de patogenicidade e virulência do microrganismo (PEREIRA e cols 1999).

Dentre estas proteínas extracelulares, pode-se destacar como importantes fatores de virulência e patogenicidade um grupo de enzimas e citotoxinas, que inclui hemolisinas, nucleases, proteases, lipases, hialuronidase e collagenase. A principal função destas proteínas pode ser a conversão do tecido hospedeiro em fontes de nutrientes para o crescimento bacteriano. Algumas cepas produzem uma ou mais exoproteínas, incluindo a toxina responsável pela síndrome do choque tóxico (TSST – 1), as enterotoxinas estafilocócicas (SEs), as toxinas esfoliativas (ETA e ETB) e leucocidina (DINGES e cols 2000).

A gastroenterite estafilocócica é causada pela ingestão de alimento contendo uma ou mais enterotoxinas pré-formadas, produzidas somente por bactérias do gênero *Staphylococcus*, embora a espécie *S. aureus* apresente consideráveis diferenças em relação às espécies coagulase negativa a respeito de sua patogenicidade, uma vez que produz elevado número de fatores de virulência e outras proteínas, enquanto as demais espécies produzem apenas alguns destes fatores (JAY 2000, CROSSLEY 1997).

A produção de enterotoxinas não está restrita à espécie *S. aureus*; outras espécies de *Staphylococcus*, são capazes de produzi-las, característica relatada para outras espécies coagulase positivas, como *S. hyicus* e *S. intermedius* (VALLE e cols 1990).

Adicionalmente, estudos laboratoriais evidenciaram espécies coagulase negativas, capazes de produzir toxinas, como *S. xylois*, *S. haemolyticus*, *S. epidermidis*, *S. cohnii*, *S. chromogenes*, *S. warneri*, *S. sciuri* e *S. lentus* (PEREIRA e cols 2001). Acreditava-se que a produção de enterotoxinas estivesse ligada às cepas produtoras

de coagulase e termonuclease (TNase), entretanto muitas espécies de *Staphylococcus* demonstraram produzir enterotoxinas mesmo na ausência de coagulase e termonuclease. Pelo menos dez das espécies coagulase negativas, listadas na Tabela 1, produzem enterotoxinas. Em um estudo sobre estafilococos isolados de caprinos saudáveis 74,3% de 70 cepas coagulase positivas e 22,0% de 272 cepas coagulase negativas eram produtoras de enterotoxinas (JAY 2000).

A produção simultânea de diferentes tipos de toxinas pode aumentar os seus efeitos toxigênicos isolados, sugerindo que essa co-produção possa desempenhar papel importante na patogenia das infecções produzidas por este microrganismo (FAGUNDES & OLIVEIRA 2004).

Além dos cinco maiores tipos antigênicos de enterotoxinas (SEA, SEB, SEC, SED e SEE), mais quatro tipos (SEG, SEH, SEI e SEJ) foram relatados e tiveram os seus genes descritos. Recentemente, a lista das enterotoxinas estafilocócicas foi expandida, através da detecção de mais genes (*seK*, *seL*, *seM*, *seN*, *seO*, *seP*, *seQ*, *seR* e *seU*) que codificam enterotoxinas homólogas, totalizando 18 tipos (BLAIOTTA e cols 2004, LOVSETH e cols 2004).

A propriedade característica mais marcante das enterotoxinas estafilocócicas é a superantigenicidade, que se refere à habilidade destas toxinas estimularem a proliferação de linfócitos T sem considerar a especificidade antigênica destas células. Os genes codificadores destas toxinas localizam-se nos plasmídeos, bacteriófagos ou elementos genéticos heterólogos denominados “ilhas de patogenicidade” (DINGES e cols 2000).

As características físico-químicas das enterotoxinas estafilocócicas incluem: proteínas simples, de peso molecular situado entre 26.000 e 29.000, estruturadas em uma única cadeia polipeptídica rica em lisina, tirosina e ácidos aspartico e glutâmico; possuem dois resíduos de cisteína, que formam alças por intermédio de pontes de dissulfeto. No estado ativo, as enterotoxinas resistem à ação de enzimas proteolíticas como pepsina, tripsina, quimiotripsina, papaína e renina. Apresentam, também, a propriedade de termorresistência, o que constitui ponto crucial em controle de qualidade de alimentos, uma vez que a enterotoxina pode persistir no produto final, após o processamento térmico (PEREIRA e cols 1999).

A capacidade de produzir uma ou mais enterotoxinas é encontrada em 30,0% a 50,0% das cepas de *S. aureus* (CARDOSO e cols 2000). MASUD e cols (1993), ao examinar 48 linhagens enterotoxigênicas de *S. aureus*, isoladas de produtos lácteos, observaram que pelo menos 16 delas produziram mais de um tipo de enterotoxina.

De acordo com LETERTRE (2003a, 2003b), SEA é a enterotoxina mais comumente encontrada nos alimentos como causa de intoxicação e sabe-se que 95,0% dos surtos de intoxicação estafilocócica são causados por SEA – SEE. Entretanto, o papel desempenhado em alimentos pelas enterotoxinas recentemente descobertas, ainda não está claro e o desenvolvimento de métodos para detecção dos genes *se* é de fundamental importância para as investigações dos surtos.

Em geral, a produção de enterotoxinas tende a ser favorecida pelas condições ótimas de pH, temperatura e Eh. Sabe-se que o estafilococo pode crescer sob condições que não favorecem a produção de enterotoxinas (JAY 2000, FORSYTHE 2002b).

A intoxicação estafilocócica se dá pela ingestão de alimentos, inicialmente contaminados com a bactéria, submetidos a temperaturas de cocção insuficientes para provocar sua destruição e depois mantidos a temperaturas inadequadas para conservação: há multiplicação bacteriana e conseqüente produção de enterotoxina. O mesmo se aplica para os alimentos contaminados após preparação correta, mas mantidos a temperaturas inadequadas de conservação (GERMANO & GERMANO 2003a).

1.5 Quadro clínico da toxinfecção estafilocócica

O quadro clínico observado na intoxicação estafilocócica tem suas principais características estabelecidas por vômito e diarreia. Náuseas, calafrios, dores abdominais e prostração ocorrem, usualmente, e o estado febril é de rara ocorrência. A intensidade dos sintomas depende da suscetibilidade individual à toxina, da quantidade de alimento contaminado ingerido, da dose ingerida e do grau de higiene da pessoa exposta (PEREIRA e cols 1999, GERMANO & GERMANO 2003a, JAY 2000, FORSYTHE 2002b).

A reação de vômito é decorrente da estimulação de receptores eméticos localizados no estômago e intestino, a qual é transmitida, então, via vago e nervos simpáticos, até o centro do vômito. Por sua vez, a estimulação diarreica, considerada como segundo

sintoma mais freqüente da intoxicação estafilocócica, tem o seu mecanismo ainda não elucidado. (PEREIRA e cols 1999)

Os sintomas clínicos se manifestam após um período de incubação médio de 4 horas (30 minutos – 8 horas) após a ingestão do alimento contendo a toxina, apresentando durabilidade fugaz, com caráter geralmente não fatal, retratada por uma fase aguda de início abrupto, mas auto-limitada e com o restabelecimento do doente observado em torno de 24 a 72 horas (PEREIRA e cols 1999, GERMANO & GERMANO 2003a, JAY 2000, FORSYTHE 2002b).

Segundo FORSYTHE (2002), uma dose de toxina menor que 1,0 µg/kg (300 a 500ng) em alimentos contaminados produzirá sintomas de intoxicação por estafilococos. Essa quantidade de toxina é produzida por 10⁵ microrganismos por grama.

NETO e cols (2002) afirmam que níveis de toxinas variando de 0,01 a 0,4µg por grama de alimento são suficientes para provocar a intoxicação, afetando indivíduos mais sensíveis, enquanto BERGDOLL (1989) refere que a dose tóxica mínima foi considerada como sendo de 0,05µg por kilograma de peso do ser humano que ingere o alimento.

Ainda não está claro como se dá o processo de desenvolvimento de imunidade nos seres humanos às toxinas estafilocócicas. Entretanto, anticorpos para um tipo de SE não conferem necessariamente imunidade à intoxicação estafilocócica, uma vez que diversas SEs são capazes de induzir a doença. Em alguns casos, anticorpos produzidos contra um tipo de SE podem desencadear reação cruzada contra outro tipo de SE. Por exemplo, anticorpos heterólogos para SEB podem conferir proteção cruzada contra SEC, devido a estas duas enterotoxinas possuírem o mesmo epítipo de ligação com os anticorpos (DINGES e cols 2000).

1.6 Epidemiologia

O *S. aureus* apresenta distribuição mundial. Estima-se que 20% até 60% da população humana possa ser portadora da bactéria, sem apresentar qualquer tipo de doença (FORSYTHE 2002, GERMANO & GERMANO 2003).

Semmelweis, há 120 anos, demonstrou a importância da transmissão de doenças infecciosas pelas mãos de manipuladores. Price (1938), “apud” CRISLEY & FOTER

(1965), estudou os tipos de bactérias na pele, classificando-as em “residentes e transitórias”. Os microrganismos transitórios, representados principalmente pelas bactérias Gram negativas, são facilmente removidos pela conscienciosa lavagem de mãos com bons detergentes. Os microrganismos residentes, na maioria Gram positivos, encontram-se em equilíbrio dinâmico como parasitas ou saprófitas na pele, embora 10,0% a 20,0% da microbiota esteja concentrada nas reentrâncias, onde os lipídios e o epitélio dificultam a sua remoção. Em muitas pessoas, os estafilococos tornam-se parte significativa da microbiota residente e, devido à patogenicidade de algumas cepas e capacidade de produzir enterotoxinas, é de grande interesse a sua eliminação nos procedimentos de lavagem de mãos.

MILLIAN (1960) e MORSE (1980) verificaram em pessoas assintomáticas, índices de portadores nasais de 30,0% a 50,0%, e MOSS e cols (1948) citado por Carvalho (1996, p.19) observaram proporções de 32,0% a 76,0% nas fossas nasais e vestíbulo nasal, respectivamente, embora possam ser encontrado em áreas anatômicas, como garganta, pavilhão auricular e mãos. Estes números são semelhantes aos encontrados no Brasil por Iaria e cols (1980) e Raddi e cols (1988).

NIELSEN (1984), pesquisando *S. aureus* no vestíbulo nasal, garganta e mãos de manipuladores de alimentos em cozinhas comerciais da cidade de São Paulo, concluiu que dos 119 manipuladores em 10 cozinhas, 99 (83,9%) foram positivos, sendo 7 (5,9%) no nariz, 17 (14,3%) na garganta, 7 (5,9%) nas mãos e 10 (8,4%) no nariz garganta e mãos.

CARVALHO & SERAFINI (1996), em pesquisa realizada com 44 manipuladores, isolou *S. aureus* em 34,7% e 47,8% das regiões da orofaringe, nasal e mãos, respectivamente. Evidenciou também que a bactéria mostrou-se mais freqüente nas mãos das mulheres, porém, mais baixa na região nasal dos homens.

RADDI e cols (1988), encontraram a proporção de portadores nasais de *S. aureus* de 41,7% entre indivíduos que manipulam alimentos e 50,0% entre estudantes universitários, sendo que 12 portadores, de 48 pesquisados, albergavam simultaneamente o microrganismo nas fossas nasais e mãos.

ANDRADE e cols (1989) verificaram a ocorrência simultânea de *S. aureus* no nariz, boca, mãos e fezes em 112 indivíduos. De 40 deles (35,7%) a bactéria em questão foi isolada de, pelo menos, um dos espécimes estudados. Entre estes portadores, 27

(67,5%) foram positivos em apenas um dos quatro espécimes, 8 (20%) em dois e 5 (12,5%) em três.

1.7 Alimentos envolvidos

Matérias-primas “in natura” ou industrializadas de bovinos, de suínos, de aves, de pescado e seus sub-produtos. O leite e seus derivados, sobretudo os queijos, também podem ser incluídos neste contexto, assim como produtos de origem vegetal.

Desta forma, os alimentos de mais ampla relação com as doenças de origem alimentar estão vinculados às condições sanitárias deficientes, à falta de higiene no preparo e ao armazenamento impróprio (GERMANO & GERMANO 2003a, SCARCELLI & PIATTI 2002).

CAMPOS (1980), relatou surtos de intoxicação alimentar produzidos por consumo de alimentos contendo entre 10^6 e 10^9 UFC/g ou mL de *S. aureus*. Dentre os alimentos envolvidos nestas intoxicações foram listados: refeições completas (52 surtos com 9.500 casos e 16 óbitos); maionese caseira (3 surtos com 800 casos); bolo recheado (20 surtos com 750 casos); queijos (23 surtos com 660 casos e 1 óbito); frango e embutidos (5 surtos com 600 casos); leite e derivados (6 surtos com 350 casos); e massas (3 surtos com 130 casos).

ZANARDI (2002) analisou 50 amostras de preparações servidas a bordo de aeronaves, à base de carne bovina, e observou que 6,0% das amostras apresentavam *S. aureus*.

PEREIRA e cols (1994), em uma investigação sobre um surto que acometeu 12 pessoas ocorrido pelo consumo de bolo recheado, isolou *S. aureus* produtor de enterotoxina A do bolo, fossa nasal, leito subungueal e, essencialmente, de uma ferida em fase de cicatrização localizada na nuca da manipuladora.

Em um levantamento sobre 53 surtos ocorridos em Campinas e notificados à Vigilância Sanitária Municipal, no período de 1987 a 1993, *S. aureus* mostrou-se responsável por 31,6% do total de surtos, sendo que 21,4% dos surtos foram relacionados com serviços de alimentação (PASSOS & KUAYE 1996).

Amostras de queijo Minas meia cura, comercializados por ambulantes, feiras livres e mercados municipais da cidade de São Paulo foram analisadas por PEDRO (2003)

para a presença de *S. aureus* e a pesquisa revelou que 26,7% do total de 60 amostras eram positivas para a bactéria citada.

Em pesquisa realizada com amostras de queijo tipo Minas frescal, comercializado na cidade de Poços de Caldas – MG, ALMEIDA FILHO & NADER FILHO (2000), evidenciaram a presença de *S. aureus* em 50% do total de 80 amostras.

Em levantamentos epidemiológicos no Brasil e no exterior, esta bactéria esteve presente em cerca de 50,0% das infecções da glândula mamária dos bovinos leiteiros, tendo sido considerado o microrganismo patogênico mais freqüentemente isolado no leite cru (BRABES 1999, ZECCONI & HAHN 2000). BRABES (1999), analisando 127 amostras de leite de 5 propriedades leiteiras dos Estados de São Paulo e Minas Gerais, encontrou uma prevalência de 40,2% para a espécie *S. aureus*. Neste mesmo estudo, verificou-se predomínio de bactérias do gênero *Staphylococcus* na etiologia da mastite em três propriedades, com percentuais de positividade entre 32,0% e 80,0%. Considerando o isolamento de 16 cepas produtoras de enterotoxinas, os dados obtidos no referido trabalho indicam um risco potencial à saúde humana associado ao consumo de leite dos rebanhos analisados, uma vez que a maioria dos casos diagnosticados de mastite era do tipo subclínico, ou seja, de animais que não apresentavam alterações visíveis na glândula mamária e tampouco no leite.

Em um estudo conduzido no Brasil por MARIANO e cols (2002), foram coletadas 184 amostras de leite caprino, das quais foram isoladas 36 (19,6%) contendo bactérias enterotoxigênicas do gênero *Staphylococcus*, sendo 14 delas (38,8%) positivas para a espécie *S. aureus*. Os autores alertaram que as enterotoxinas produzidas permanecem no leite pasteurizado graças à sua termoestabilidade, tornando-se um risco potencial à saúde dos consumidores de leite de cabras.

A presença de enterotoxinas estafilocócicas no leite e nos produtos lácteos tem sido constatada em diversos estudos (GENIGEORGIS 1989, ADESIYUM e cols 1998).

ROSEC e cols (1997), analisando queijos elaborados com leite cru, observaram a presença de toxina tipo C em 73,7% das 61 amostras analisadas.

FURNALETTO e cols (1987) pesquisaram a presença de *S. aureus* no leite de 486 vacas pertencentes a 6 rebanhos produtores de leite tipo B da região de Barretos e encontraram 44,6% de positividade para cepas da bactéria em estudo.

ARAÚJO e cols (1989b) encontraram *S. aureus* em 50,0% de um total de 100 amostras de leite cru, obtidas na plataforma de recepção da Usina de Pasteurização do Centro Intraunidade de Zootecnia da Universidade de São Paulo, localizada no Município de Pirassununga.

Em um trabalho sobre a caracterização da origem provável, humana ou bovina, das cepas de *S. aureus* isoladas de leite cru, ARAÚJO e cols (1989a) revelaram que 19,9% das cepas foram consideradas de origem provável humana, 10,4% bovina e 27,9% intermediárias, com tendência a serem de provável origem humana e bovina.

1.8 Treinamento de manipuladores como base de prevenção

Parece consenso entre diversos autores a importância que a capacitação de manipuladores representa no sentido de minimizar a ocorrência de contaminações dos alimentos. Frequentemente, o treinamento de manipuladores é recomendado como uma medida eficiente e econômica de evitar surtos por DTAs (GERMANO 2003a).

O treinamento, como qualquer outra atividade educativa, requer atenção especial envolvendo diversas fases desde o diagnóstico das necessidades, passando pelo planejamento, execução, acompanhamento e avaliação, para que cumpra seu papel e não consista meramente em uma exigência legal (GERMANO 2003a).

No que diz respeito ao treinamento de manipuladores de alimentos, em termos de Brasil, uma primeira dificuldade refere-se ao baixo nível de escolaridade da população que atua nesta função. Todavia, o aspecto primordial do treinamento consiste em visar não somente aquisição de conhecimentos, mas mudança de comportamentos que o indivíduo internalizou desde a mais tenra idade e que fazem parte de sua cultura, mediante atividades variadas e participativas (GERMANO 2003a).

Em empresas de refeições coletivas e em várias unidades de alimentação e nutrição tem-se verificado a realização de treinamentos orientados por meio de “manuais”, cuja característica básica é o nivelamento, a “standardização” dos trabalhadores, aplicando indistintamente um “treinamento de norte a sul”. Essa é, por sinal, a estratégia das grandes empresas do setor para alcançar a tão almejada padronização de processos, uma das práticas difundidas no ideário dos programas de qualidade

total, pelo menos na forma como eles vêm sendo adotados pelas empresas brasileiras. (CORRÊA).

Evidentemente, diante de valores enraizados, os treinamentos não proporcionam mudanças efetivas e duradouras. Percebe-se que, após o término da intervenção direta dos treinadores, os manipuladores de alimentos retornam aos seus antigos hábitos. Uma das possíveis explicações para tal fato é a existência de um hiato entre o conteúdo transmitido nos treinamentos e a realidade de vida dos sujeitos. Ao que parece, os idealizadores e executores dos treinamentos não o têm considerado como um recurso no processo de aprendizagem e sim como um instrumento capaz de “adestrar” ou “reprimir” seus conteúdos até a “exaustão” (CORRÊA).

Diante desse quadro em que não apenas os métodos como também os recursos utilizados desfavorecem o alcance dos objetivos, parece que o entrave está não unicamente nos métodos e nos recursos utilizados: há sujeitos para os quais deveriam ser direcionadas as ações de treinamento, cujo conteúdo deveria ser estruturado com base em outras variáveis que não unicamente o grau de escolaridade dos indivíduos (GERMANO 2003a).

De uma maneira geral, os dados relativos aos resultados obtidos através da realização de treinamento para manipuladores de alimentos indicam a importância desta atividade para a segurança alimentar, estando de acordo com os dados da literatura. No que concerne às respostas dos entrevistados, obtidas na pesquisa em que baseia-se esta referência, parecem estar em conformidade com a realidade das organizações em que atuam, podendo-se dizer que existem uma diversidade de resultados na medida em que o processo de inserção do treinamento não se encontra no mesmo nível em todas as empresas (GERMANO 2003a).

De acordo com a pesquisa desenvolvida por GERMANO (2002), o treinamento de manipuladores foi considerado importante para garantir a qualidade dos alimentos, assim como a segurança alimentar dos consumidores. Todavia a atividade, ainda, não constituía ação promotora da saúde, apesar de haver indícios de uma consciência nesta direção. Recomendam-se ações no âmbito dos órgãos públicos, privados e dos responsáveis pelo treinamento que conduzam as intervenções de promoção da saúde (GERMANO 2002).

1.9 Diagnóstico

1.9.1 Métodos Convencionais

Atualmente, órgãos internacionais como World Health Organization (WHO), International Committee on Microbiological Specification for Foods (ICMSF) e a American Public Health (EPHA) recomendam padrões e métodos de análise microbiológica, tanto clínica como de alimentos, para a rotina laboratorial, testes bioquímicos mínimos para a diferenciação na área clínica de *S. aureus*, *S. epidermidis* e *S. saprophyticus* e, em análise de alimentos, são recomendados os testes de produção de coagulase, termonuclease, coloração de Gram e catalase, permitindo diferenciar o *S. aureus* de *S. intermedius* e de *S. hyicus* (NETO e cols 2002, BRASIL 2001, SILVA 1997, SPECK 1976).

O Ministério da Saúde, através da Portaria 451 de 19/05/1997, anexo II (BRASIL 1997), regulamenta a utilização dos testes citados, referindo que cepa positiva, para todos os testes, é classificada como *S. aureus*, exceto quando isolada de leite e produtos derivados, nos quais as cepas reativas recebem a denominação de estafilococo coagulase positivo.

1.9.2 Métodos Moleculares

Os sistemas de tipagem epidemiológicos são utilizados para estudar a dispersão e a dinâmica populacional bacteriana, ou de qualquer microrganismo que apresente reprodução assexuada, na natureza ou na clínica, numa amplitude que pode variar entre um único hospedeiro ou um ecossistema populacional mundial (STRUELENS e cols 1996).

Através do seqüenciamento das moléculas de ácido desoxirribonucleico (DNA) e de ácido ribonucleico (RNA) observou-se que algumas regiões destas moléculas possuem regiões altamente conservadas que podem ser utilizadas para alocar um dado organismo em uma árvore evolutiva (LUDWIG e cols 1994, RELMAN 1994).

Mediante a consulta a banco de dados especializados pode-se obter informação de similaridade dessas seqüências com as seqüências obtidas de organismos novos ou para a confirmação de outros. Através dessa similaridade é possível o desenho de iniciadores ou sondas para a pesquisa desses organismos em fontes prováveis de

contaminação ou ainda para a detecção de novos casos que venham a surgir (MATTÉ 2004).

Os métodos de tipagem que avaliam diferenças fenotípicas são inerentemente limitados pela possibilidade de alteração da expressão dos genes. Tais mudanças podem ocorrer aleatoriamente ou como resposta a vários estímulos ambientais. Além disso, mutações nos nucleotídeos podem resultar em regulação ou função anormal do gene responsável por um fenótipo particular. Complementarmente, métodos que avaliam fenótipos, tais como sorotipagem e tipagem por bacteriófagos, exigem reagentes específicos para cada tipo. Deste modo, cepas não tipáveis incluirão não somente cepas que expressam fenótipos nulos, mas também cepas que expressam fenótipos para reagentes não disponíveis (CROSSLEY 1997).

O avanço da biologia molecular proporcionou o surgimento de novas técnicas de tipagem: as genotipagens, que têm se desenvolvido ao longo dos anos. Inicialmente essas técnicas eram utilizadas somente por alguns laboratórios de pesquisa, no entanto, têm sido amplamente utilizadas na prática clínica (CROSSLEY 1997, TRINDADE e cols 2003).

- **Análise do Perfil Plasmidial**

O termo plasmídio designa DNA extracromossômico que se replica de forma autônoma. Os plasmídios podem codificar uma ampla variedade de determinantes genéticos que permitirão que seu hospedeiro sobreviva melhor em situações adversas (MATTÉ 2003).

Alguns plasmídios podem ser responsáveis pela produção de toxinas, outros podem conter genes responsáveis pela resistência da célula hospedeira a íons, metais pesados e antibióticos, ou ainda existem os que são responsáveis por atividades catabólicas (BROCK e cols 1994).

A análise dos plasmídios bacterianos foi a primeira técnica molecular utilizada para investigação epidemiológica de cepas de *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA). Esta técnica consiste na extração do DNA plasmidial e subsequente separação deste DNA através de eletroforese em gel de agarose. É uma técnica de fácil execução e interpretação, embora possua muitas limitações, especialmente relacionadas ao fato

de que os plasmídios são elementos extracromossômicos que podem ser facilmente perdidos ou adquiridos pela bactéria (TRINDADE e cols 2003).

- **Digestão com Enzimas de Restrição (RFLP)**

No método RFLP – *Restriction Fragment Length Polymorphism* o DNA é clivado por enzimas de restrição, que reconhecem uma sequência específica na dupla fita de DNA. Após a clivagem é possível o estudo e comparação dos perfis obtidos, pela visualização dos fragmentos de restrição, através de eletroforese (MATTÉ 2003).

Esse método, entretanto, apresenta desvantagens quando o DNA é muito grande, pois o polimorfismo apresentado é de difícil visualização e o número e dimensões dos fragmentos gerados podem ser determinados de forma subjetiva, podendo existir fragmentos muito próximos (MATTÉ 2003).

- **Ribotipagem**

A ribotipagem é uma técnica baseada na análise de fragmentos obtidos após a digestão do DNA genômico por enzimas de restrição (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) e no uso de uma sonda genética para as frações 16S+23S do ácido ribonucleico ribossomal (rRNA) obtidas de *Escherichia coli* (ATLAS & BARTHA 1993).

Apresenta boa reprodutibilidade e poder discriminatório para caracterizações epidemiológicas, entretanto possui baixa capacidade de diferenciar os isolados, quando comparada com outras técnicas (TRINDADE e cols 2003).

- **Eletroforese em campo pulsado**

A técnica denominada *Pulsed-Field Gel Electrophoresis* (PFGE), desenvolvida por SCHWARZ & CANTOR (1984), é baseada na digestão do DNA bacteriano com endonucleases de restrição que reconhecem poucas partes ao longo do cromossomo, geralmente fragmentos grandes de DNA (10 – 800 kb) que não podem ser efetivamente separados pela eletroforese convencional. No PFGE, a orientação da corrente elétrica no gel é periodicamente mudada (pulsada), permitindo que os fragmentos de DNA (os pares de bases) sejam efetivamente separados de acordo com o tamanho. Conseqüentemente, PFGE permite a comparação do DNA cromossômico

com perfil muito mais simples do que os gerados pelas endonucleases de restrição de maior frequência. Teoricamente, todas as bactérias podem ser tipadas por PFGE e os resultados são altamente reprodutíveis. Esse método requer DNA intacto e cuidado especial deve ser tomado durante o isolamento do DNA. A fim de evitar o rompimento do DNA por choque mecânico, cada amostra é incorporada em um pequeno cubo de agarose (plug), protegendo o DNA, e permitindo ao mesmo tempo o fluxo de soluções necessárias para a lise da parede celular e a digestão enzimática das proteínas celulares. O DNA isolado é então submetido à digestão com endonucleases de restrição que reconhecem poucas partes ao longo do cromossomo. O plug de agarose contendo o DNA digerido é submetido ao PFGE (TRINDADE e cols 2003).

Este método tem sido amplamente utilizado para a compreensão da epidemiologia de cepas de *S. aureus*, especialmente as resistentes à meticilina. Os isolados que possuem o mesmo perfil têm sido considerados como idênticos. No Brasil, esta técnica tem grande importância para a elucidação de surtos de infecções causadas por cepas MRSA, que apresentou característica endêmica durante as últimas décadas (TRINDADE e cols 2003).

- **Reação em cadeia pela polimerase (PCR)**

A técnica denominada reação em cadeia pela polimerase (PCR) possibilita a amplificação de seqüências específicas de DNA utilizando iniciadores (*primers*). Essa técnica vem sendo utilizada para detecção de microrganismos, detecção de genes codificadores de fatores de virulência, bem como para gerar polimorfismo que tenha importância na caracterização interespecies, em estudos taxonômicos e em epidemiologia molecular (VERSALOVIC e cols 1991, SINGH e cols 2001).

As técnicas que envolvem a reação em cadeia pela polimerase (PCR) apresentam três estágios principais. O primeiro, a denaturação, exige altas temperaturas e é necessário para a separação da dupla fita do DNA em duas fitas simples. No segundo estágio, há o anelamento dos iniciadores presentes na reação que complementam a região da fita do DNA pesquisada. A temperatura do anelamento é muito importante, determinando a especificidade da reação. O terceiro estágio, em síntese, é a polimerização através da enzima DNA polimerase (Taq DNA Polimerase),

estendendo os iniciadores. A Taq DNA Polimerase funciona na presença de íons de Magnésio (Mg^{2+}) e dos quatro desoxiribonucleotídeos trifosfatos (dNTPs) e resulta na duplicação da região de interesse *ad libitum*. Cada ciclo completo leva cerca de cinco minutos e dobra a quantidade de DNA produzido nos ciclos anteriores. Para uma amplificação eficiente de DNA, são necessários de 20 a 40 ciclos (TRINDADE e cols 2003).

O método de PCR deu origem a uma variedade de técnicas com diversas aplicações, dentre elas, a diferenciação entre os isolados bacterianos.

O AP-PCR (*Arbitrary Primers-PCR*) ou RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) é uma variação do PCR clássico e foi proposto por WILLIAMS e cols (1990) e por WELSH & MCCLELAND (1990) para análise genética dos microrganismos. Esta técnica envolve a amplificação randômica de segmentos da fita de DNA, utilizando um conjunto universal de iniciadores e pode ser utilizada para análise do DNA genômico de uma variedade de espécies. Desta forma, foram desenvolvidos iniciadores de seqüências conhecidas a saber:

- Seqüências intergênicas repetitivas unânimes em enterobactérias específicas, (*Enterobacteria repetitive intergenic concensus*) que receberam a denominação ERIC, compostas de cento e vinte e quatro a cento e vinte e sete pares de bases e que podem ser usadas como iniciadores para obter uma diferenciação genética (MATTÉ 2003).

- Seqüências palindrômicas repetitivas extragênicas, denominadas REP (*Repetitive extragenic palindromic sequence*) compostas de trinta e cinco a quarenta pares de bases, e ainda seqüências chamadas BOX, com cento e cinqüenta e quatro pares de bases e que apresentam 3 sub-unidades (Box A, Box B, Box C), que parecem estar localizadas em regiões intergênicas distintas ao redor do genoma (MATTÉ 2003). Após amplificação, as bandas geradas, são separadas por eletroforese em gel de agarose, que fornece um perfil de padrão complexo o qual lembra um código de barras que funciona como uma impressão digital para uma cepa bacteriana específica (MATTÉ 2003).

Diante da importância do papel do *S. aureus* em Saúde Pública, estudos epidemiológicos de cepas deste patógeno vêm sendo realizados na tentativa de se estabelecer sua disseminação e perpetuação ambiental (RADDI E COLS 1988).

Todavia, a literatura oferece poucos estudos sobre as características genéticas de cepas recuperadas de manipuladores e suas semelhanças com aquelas isoladas de alimentos, justificando a realização desta pesquisa.

2. OBJETIVOS

Comparar geneticamente cepas de *S. aureus* isoladas das mãos de manipuladores de alimentos com cepas da mesma bactéria, recuperadas de alimentos e veiculadas por formigas, mediante:

- Confirmação da espécie *aureus*, pela técnica reação em cadeia pela polimerase (PCR);
- comparação do perfil plasmidial das cepas;
- pesquisa do gene para produção da enterotoxina SEA e
- comparação dos padrões de bandas encontrados pela técnica molecular ERIC-PCR.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostragem

Neste estudo foram utilizadas cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas de peixes (5), queijo (6), bentô (5) e veiculadas por formigas encontradas em cozinhas industriais (2), pertencentes à coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular do Departamento de Prática de Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública da USP (total de 18 cepas) e cepas, da mesma espécie, recuperadas das mãos de manipuladores de alimentos (13) de uma cozinha industrial de grande porte.

3.2 Técnica de coleta das amostras obtidas dos manipuladores

As amostras obtidas a partir das mãos dos manipuladores de alimentos foram coletadas utilizando-se a técnica de suabe. Foram realizadas duas coletas de material dos manipuladores, dentro de um intervalo de 90 (noventa) dias. As coletas foram realizadas da seguinte forma: de cada manipulador foram coletados 2 (dois) suabes, sendo um antes da higienização de mãos e outro imediatamente antes da próxima higienização coletiva de mãos.

Cada coleta foi realizada em um dia, previamente agendado, durante o período de trabalho dos manipuladores, sem prejuízo da rotina de cada um, nem do próprio serviço. A primeira coleta contemplou 27 manipuladores e a segunda, apenas 22 manipuladores. Esta diferença ocorreu, pois 5 funcionários encontravam-se de folga, férias ou afastados do trabalho.

O material colhido foi transportado até o Laboratório de Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo em meio de cultura de transporte Caldo Lúria (Tryptona 1%, OXOID; extrato de levedura 0,4%, OXOID; cloreto de sódio 0,5%, GRUPO QUÍMICA) para viabilização das bactérias contidas na amostra.

3.3 Análises Microbiológica e Bioquímica

O isolamento das bactérias contidas nos suabes coletados dos manipuladores foi realizado em meio de cultura seletivo para *Staphylococcus* spp, *Baird-Parker* ágar base (MERCK). Após a semeadura, as placas do meio seletivo foram incubadas a 37°C por 48 horas. De cada manipulador, foram isoladas 6 (seis) colônias que

cresceram com características morfológicas de *Staphylococcus aureus* (coloração negra com duplo halo - branco e este circundado por halo transparente) e estas cepas foram submetidas às provas para identificação da espécie.

A identificação da espécie *aureus* foi baseada em reações positivas nos testes de catalase, DNase (BIOLIFE) e verificação microscópica da morfologia das células isoladas, realizada pelo método de Gram com lâminas, onde as células que se apresentaram como cocos Gram positivos, agrupados em forma de cacho, foram consideradas da espécie pesquisada (EATON e cols 1995).

3.4 Estocagem das culturas

As cepas pertencentes a coleção de culturas do laboratório supracitado foram reativadas em 2 mL de caldo Lúria incubados a 37°C por 24 horas.

Todas as cepas, incluindo as isoladas dos manipuladores, foram estocadas em microtubos de polipropileno contendo 0,5 mL de caldo Lúria com 30% de glicerina estéril para conservação a -70°C para estudos posteriores.

3.5 Extração do DNA genômico

Foram utilizados 2 métodos para extração do DNA genômico: o método por choque térmico, para a confirmação da espécie e pesquisa de gene para enterotoxina, e o método desenvolvido por ALMEIDA (2004) com modificações, para a realização da técnica ERIC-PCR.

- **Método por choque térmico**

Foram cultivados 10mL de cultura em caldo Lúria a 37°C por 24 horas, centrifugados em tubo Falcon a 5.000rpm/10'/24°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuscitado com 1mL de *MilliQ* estéril. Esta solução foi transferida para um novo eppendorf e centrifugada a 12.000rpm/3'/24°C. O sobrenadante foi, novamente, descartado e o pellet ressuscitado com 200µl de *MilliQ* estéril. O eppendorf foi colocado em água fervente 95°C por 10minutos, colocado imediatamente em freezer -20°C por 30 minutos e, posteriormente, levado a temperatura ambiente através de água corrente ou banho-maria a 65°C por 1 minuto. O tubo foi centrifugado a

12.000rpm/10'/24°C e o sobrenadante transferido para outro eppendorf, pronto para ser utilizado.

- **Método desenvolvido por ALMEIDA (2004) com modificações**

Um e meio mL de cultura das cepas foram incubados a 35°C por 24 horas em caldo Lúria e centrifugados a 12.000 rpm por 5 minutos.

O sedimento limpo foi ressuspense em 500 µL da solução de lise contendo β-mercaptoetanol [50 µL de 100 mM Tris-HCL (pH 8.0) + 50 µL 50 mM EDTA (pH 8.0) + 50 µL SDS 10% + 3,5 µL 70 mM β-mercaptoetanol + 346,5 µL de água Milli-Q] e incubado em banho-maria a 65°C por 15 minutos. Após essa incubação inicial, foram acrescentados 20 µL de Proteinase K, incubando-se novamente em banho-maria a 65°C por mais 15 minutos. Para parar a reação cada tubo foi colocado em banho de gelo a 0°C por 10 minutos e deixado a temperatura ambiente por 15 minutos.

Para a extração de DNA acrescentou-se 500 µL da solução de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1), centrifugando-se a 12000 rpm por 15 minutos. Com o auxílio de pipeta automática, os sobrenadantes foram transferidos para outros tubos e acrescentado-se 500 µL de clorofórmio puro, centrifugando-se a 12000 rpm por 15 minutos. Cuidadosamente, com a pipeta automática, os sobrenadantes foram novamente transferidos para outros tubos, acrescentando-se 500 µL de isopropanol gelado e centrifugado a 12000 rpm por 3 minutos. O sobrenadante foi descartado e acrescentado 500µL de etanol gelado e centrifugando-se a 12000 rpm por 3 minutos. Descartados os sobrenadantes, os tubos foram secados à vácuo por 12 horas. Os DNAs foram eluídos com 50µL do tampão TEII (Tris-EDTA) e armazenados a 4°C até o momento de serem utilizados na amplificação pela reação em cadeia pela polimerase.

3.6 Extração do DNA Plasmidial

Para extração do DNA plasmidial, as cepas foram semeadas em 3 mL de caldo Lúria e cultivadas por 18 horas a 35 °C, após esse período as amostras foram semeadas em 6 mL de caldo Lúria e foram, novamente, incubadas por 18 horas a 35 °C. As

amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 5.000 rpm e os sobrenadantes foram descartados. Os sedimentos foram ressuspensos em 1 mL de solução salina 0,85 % estéril e essas soluções contendo o crescimento bacteriano foram transferidas para um microtubo tipo eppendorf.

Os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 10.000 rpm e ao sedimento foi adicionado 100 µL de solução I (Lisozima 4 mg, 0,1ml Glicose 2%, 0,02ml EDTA 10 mM, 0,025ml Tris-HCl (pH=8,0) 25 mM, completar 1 ml com H₂O destilada ou água *MilliQ*). Os tubos foram incubados em banho de gelo por 30 minutos.

Adicionou-se então, 200 µL de solução II (NaOH 0,2 N, SDS 1,0 %) e as amostras foram incubadas em banho de gelo por 5 minutos. Foram adicionados 150 µL de solução III (Solução de Acetato de sódio 3 Molar pH=4,8), e homogeneizados por inversão de 12 a 15 vezes, até ser observada a formação de um precipitado branco floculento e os tubos foram incubados em freezer -20 °C por uma hora e trinta minutos.

As amostras foram centrifugadas a 4 °C por 25 minutos à velocidade de 10.000 rpm. Os sobrenadantes foram transferidos para outros microtubos (aproximadamente 400 µL) e foi adicionado 1 mL de etanol P.A. gelado (-20 °C); as amostras foram incubadas por no mínimo 1 hora a -20 °C. Após esse período, as amostras foram centrifugadas por 25 minutos a 10.000 rpm a 4 °C.

Os sobrenadantes foram descartados cuidadosamente por inversão dos tubos, e os precipitados foram ressuspensos em 100 µL de solução IV (Acetato de sódio 100 mM Tris-HCl (pH=8,0) 50 mM), e em seguida foram adicionados 250 µL de etanol P.A. gelado (-20 °C).

Os tubos foram homogeneizados por inversão, e incubados por 18 horas a -20 °C. Após esse período, foram centrifugados por 20 minutos a 10.000 rpm a 4 °C.

Os sobrenadantes foram descartados e foi adicionado ao precipitado, 1 mL de etanol 70% gelado. Os tubos foram centrifugados novamente por 20 minutos a 10.000 rpm a 4 °C, e os sobrenadantes foram descartados.

Os sedimentos foram secos à vácuo e após 24 horas, os sedimentos foram dissolvidos em 15 µL de tampão TE II (Tris-EDTA).

Os materiais obtidos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,2% com intensidade de 80 V por 4 horas. Ao final, o gel de agarose foi corado com brometo de etídio e submetido a uma fonte de luz ultravioleta para a detecção de bandas de plasmídeo. A imagem foi capturada através do sistema de aquisição de imagens Epi Chemi II Darkroom (UVP) e software Labworks (UVP).

Para determinação do peso molecular dos fragmentos obtidos foi utilizado o marcador de peso molecular 1Kb λ Ladder contendo fragmentos com peso molecular em intervalos adicionais de 48,5 Kb (BIO-RAD). A determinação da relação entre as cepas foi realizada através de comparação visual do tamanho dos fragmentos.

3.7 Confirmação da espécie *aureus* por PCR

As cepas foram submetidas à prova molecular Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR), para confirmação da espécie *aureus*, utilizando os iniciadores correspondentes a regiões específicas dos genes 16S rRNA das espécies de *Staphylococcus*, descrito por MASON e cols (2001):

CCTATAAGACTGGGATAACTTCGGG-5'

CTTTGAGTTTCAACCTTGCGGTCG-3'

O PCR foi realizado usando master mix contendo *MilliQ* estéril, tampão 1X, 3mM MgCl, Dntp 200 μ M, 2 uM cada primer e 1,25U *Taq* polimerase para uma reação de 25 μ l. Cada tubo *ependorf* continha 5,0 μ l do DNA da cepa. Os parâmetros do ciclo para amplificação foram (1) 94°C por 3 minutos, (2) 94°C por 1,5 minutos, (3) 55°C por 1 minuto, (4) 72°C por 1 minuto., 36 ciclos dos passos 2 a 4 inclusive, e (5) 72°C por 10 minutos. Para visualização das bandas, o material obtido foi corado com tampão corante Brometo de Etídio e submetido à eletroforese em gel de agarose 1,2% (Biolife) com intensidade de 80V por 4 horas. Ao final, o gel de agarose foi submetido a uma fonte de luz ultravioleta para a detecção das bandas. A imagem foi capturada através do sistema de aquisição de imagens EPI Chemi II Darkroom (UVP) e software Labworks (UVP).

Para determinação do peso molecular dos fragmentos obtidos, utilizou-se o marcador de peso molecular 1Kb λ Ladder contendo fragmentos com peso molecular em intervalos adicionais de 48,5 Kb (Bio-Rad). A determinação da relação entre as cepas foi realizada através de comparação visual do tamanho dos fragmentos.

3.8 PCR para verificação da presença do gene codificador para enterotoxina SEA

Para a detecção do gene que codifica para a produção de enterotoxina SEA, foi realizada a reação de PCR, utilizando o par de iniciadores descrito por KONG e cols (1995):

SAU-F:5'-GCTAGACGGTAAACAAAATAC-3'

SAU-R:5'TTCAGTAATGCCACCATAGGC-3'

O PCR foi realizado usando *master mix* contendo *MilliQ* estéril, tampão 1X, 3mM MgCl₂, Dntp 200μM, 2 uM cada *primer* e 1,25U *Taq* polimerase para uma reação de 25 μl. Cada tubo *ependorf* continha 5,0μl do DNA da cepa. Os parâmetros do ciclo para amplificação foram (1) 94°C por 2 minutos, (2) 94°C por 1 minuto, (3) 50°C por 1 minuto, (4) 72°C por 1 minuto, 30 ciclos dos passos 2 a 4 inclusive, e (5) 72°C por 3 minutos, de acordo com Kong e cols (1995) com modificações. A temperatura de anelamento (*Basic Melting Temperature*) foi recalculada, de acordo com o site www.in-silico.com/tm.php?primer.

De acordo com KONG e cols (1995), o fragmento de 480 bp, caracteriza a presença do gene para produção da enterotoxina SEA.

Os procedimentos para visualização e análise das bandas foram os mesmos que os utilizados para a confirmação da espécie.

3.9 ERIC-PCR

A técnica de ERIC-PCR foi realizada com as cepas que sofreram a extração de DNA pelo método de Almeida (2004) com modificações e obtiveram concentração suficiente de DNA, portanto, apenas 9 cepas puderam ser submetidas a esta técnica.

Para as seqüências ERIC foram utilizados os iniciadores descritos por VERSALOVIC e cols (1991):

ERIC 1: 5'ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3'

ERIC 2: 5'AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3'

O programa da reação de amplificação do ERIC-PCR constou de: um ciclo inicial a 95°C por 5 minutos; 30 ciclos de desnaturação a 92°C por 45 segundos; anelamento a 52°C por 1 min.; extensão a 70°C por um período de 10 minutos; um ciclo final de extensão a 70°C por um período de 20 minutos. Os produtos de amplificação foram

refrigerados a 4°C e assim mantidos até a retirada do termociclador. Os produtos de PCR foram separados por meio de eletroforese horizontal em gel de agarose 1,8% por um período de 6 horas à uma intensidade de corrente de 2,3V/cm.

Os procedimentos para visualização das bandas foi o mesmo que o utilizado para a confirmação da espécie.

Os perfis obtidos pela técnica de ERIC-PCR foram analisados e agrupados com a utilização do *software* específico desenvolvido para a comparação do padrão de bandas, usando coeficiente de Pearson (GelWorks 1D Advanced UVP, versão 4.01).

Os perfis encontrados foram graficamente demonstrados por um dendrograma.

3.10 Aspectos Éticos

Diante de fato de que esta pesquisa envolveu seres humanos, foram atendidas as exigências éticas fundamentais, de acordo com a RESOLUCAO CNS/196 de 10/10/96:

- ✓ Consentimento livre e esclarecido dos manipuladores, através de esclarecimento em linguagem acessível (Anexo I).

4. RESULTADOS

4.1 Análises Microbiológica e Bioquímica

Os resultados das análises microbiológicas dos suabes das mãos dos manipuladores revelaram que, na primeira coleta, 11 cepas, recuperadas de 6 manipuladores (22,2% - 6/27), foram identificadas como *Staphylococcus aureus*, através dos testes bioquímicos e morfologia. Já na segunda coleta, apenas 2 cepas foram caracterizadas como *S. aureus*, recuperadas de 2 (9,1% - 2/22) manipuladores, conforme mostra a Tabela 1. Dos manipuladores positivos para *S. aureus* nos testes morfológico e bioquímicos, a partir de 1 deles, foram isoladas 6 cepas (46,2% - 6/13). Revelou-se, portanto, que 18,4% (8/49) dos manipuladores albergavam *S. aureus* nas mãos.

Na primeira coleta, a prevalência de *S. aureus* foi maior na amostragem anterior à higienização das mãos, ou seja, antes de entrarem para a linha de produção, sendo encontradas 8 cepas nesta fase. As outras 3 cepas foram recuperadas das mãos dos manipuladores no momento que antecedia a primeira lavagem coletiva de mãos durante o período de trabalho. Já na segunda coleta, as 2 cepas encontradas foram recuperadas no momento que antecedia a primeira lavagem coletiva de mãos, isto é, não foram isoladas bactérias anteriormente à higienização de mãos antes de entrarem para a linha de produção.

Tabela 1 – Cepas caracterizadas como *S. aureus*, recuperadas das mãos de manipuladores de alimentos

1ª coleta		
Identificação do manipulador	Momento da coleta	Nº de cepas positivas
3	B	1
5	A	1
11	B	1
15	A	1
17	A	6
23	B	1
Total 1ª coleta		11
2ª coleta		
Identificação do manipulador	Momento da coleta	Nº de cepas positivas
34	B	1
46	B	1
Total 2ª coleta		2

Legenda: A - antes de entrar na linha de produção; B - anterior à higienização de mãos coletiva – dentro da linha de produção

4.2 Confirmação da espécie *aureus* por PCR

Para a confirmação da espécie *aureus* pela reação em cadeia pela polimerase (PCR), foram examinadas as 13 cepas isoladas de manipuladores caracterizadas bioquímica e morfológicamente como *aureus*, 16 cepas recuperadas de alimentos e 4 cepas veiculadas por formigas. Para 1 cepa recuperada de alimento a técnica de extração de DNA genômico através de choque térmico não foi eficiente, não sendo possível a confirmação da espécie.

Foram consideradas positivas para a espécie *aureus*, as cepas que apresentaram banda com tamanho de 800 bp, conforme MASON e cols (2001). As bandas encontradas, que apresentaram tamanho diferente do citado foram desconsideradas. O Quadro 3 mostra os resultados obtidos após a reação em cadeia pela polimerase.

Do total das amostras analisadas, 2 (15,4%) cepas recuperadas de manipuladores foram consideradas positivas para a espécie *aureus*, enquanto que 10 (62,5%) cepas recuperadas de alimentos e 4 (100%) cepas veiculadas por formigas deram resultado positivo, conforme Figura 1.

Evidenciou-se após a confirmação da espécie por PCR, portanto, que apenas 4,1% (2/49) apresentavam *S. aureus* nas mãos.

Quadro 3 – Cepas de *S. aureus* submetidas à reação em cadeia pela polimerase para confirmação da espécie, São Paulo, 2005.

Identificação da cepa	Fonte	Resultado confirmação da espécie por PCR
1	Manipulador	-
2	Manipulador	+
3	Manipulador	-
4	Manipulador	-
5	Manipulador	-
6	Manipulador	-
7	Manipulador	-
8	Manipulador	-
9	Manipulador	-
10	Manipulador	+
11	Manipulador	-
12	Manipulador	-
13	Manipulador	-
14	Bentô	●
15	Bentô	+
16	Bentô	-
17	Bentô	-
18	Bentô	+
19	Peixe	-
20	Peixe	-
21	Peixe	+
22	Peixe	+
23	Peixe	+
24	Queijo	-
25	Queijo	-
26	Queijo	+
27	Queijo	+
28	Queijo	+
29	Queijo	+
30	Veiculada por formiga	+
31	Veiculada por formiga	+
32	Veiculada por formiga	+
33	Veiculada por formiga	+

Legenda: ● teste não realizado; + *S. aureus*; - *Staphylococcus* spp

Figura 1 – Resultado da reação em cadeia pela polimerase, utilizando os iniciadores correspondentes a regiões específicas dos genes 16S rRNA das espécies de *Staphylococcus*. O fragmento de tamanho 800 bp caracteriza a espécie *aureus*.

4.3 Perfil Plasmidial

Realizou-se o perfil plasmidial antes da confirmação da espécie *aureus* por PCR e 2 cepas veiculadas por formigas não foram submetidas ao PCR, portanto 32 cepas foram submetidas à extração do DNA plasmidial. O Quadro 5 mostra os resultados do PCR para a presença de plasmídios.

Os resultados revelaram que 100,0% (2/2) das cepas recuperadas de manipuladores e confirmadas como *S. aureus* revelaram presença de bandas de plasmídios, 50,0% (5/10) das isoladas de alimentos demonstraram possuir plasmídios e 100,0% (2/2) cepas veiculadas por formigas apresentaram bandas de plasmídios.

A análise dos perfis revelou que 2 cepas (10 e 17) apresentaram bandas de aproximadamente 2000 bp; 2 (2 e 25) de tamanho intermediário entre 2000 bp e 3000 bp; 2 (2 e 22) de aproximadamente 3000 bp e 8 (2, 10, 22, 25, 26, 29, 30 e 31) de alto peso molecular (acima de 12.000 bp).

As cepas 22 e 25 apresentaram perfil de bandas bastante similar e as cepas 29, 30 e 31 também foram bastante semelhantes.

Quadro 5 – Presença de plasmídios em cepas de *S. aureus* segundo a fonte de isolamento, São Paulo, 2005.

Identificação da cepa	Fonte	Resultado confirmação da espécie por PCR	Presença de plasmídios
1	Manipulador	-	+
2	Manipulador	+	+
3	Manipulador	-	+
4	Manipulador	-	+
5	Manipulador	-	+
6	Manipulador	-	+
7	Manipulador	-	+
8	Manipulador	-	+
9	Manipulador	-	+
10	Manipulador	+	+
11	Manipulador	-	-
12	Manipulador	-	+
13	Manipulador	-	-
14	Bentô	●	-
15	Bentô	+	+
16	Bentô	-	-
17	Bentô	-	+
18	Bentô	+	-
19	Peixe	-	-
20	Peixe	-	-
21	Peixe	+	-
22	Peixe	+	+
23	Peixe	+	+
24	Queijo	-	+
25	Queijo	-	-
26	Queijo	+	+
27	Queijo	+	+
28	Queijo	+	-
29	Queijo	+	+
30	Veiculada por formiga	+	+
31	Veiculada por formiga	+	+

Legenda: lacunas em cinza – cepas de interesse; + presença de plasmídios; - ausência de plasmídios; ● teste não realizado

4.4 Identificação de gene para produção da enterotoxina A (SEA)

O Quadro 6 mostra os resultados da reação em cadeia pela polimerase para a presença do gene *sea*, que codifica a enterotoxina A (SEA) para as 14 cepas de *Staphylococcus* caracterizadas como *aureus*.

Os resultados revelaram que 11 (78,6%) cepas possuíam a banda característica da presença do gene para a produção de enterotoxina SEA, conforme Figura 2.

Quadro 6 – Resultado da PCR para detecção da presença do gene *sea* para cepas de *S. aureus* relacionadas a alimentos, segundo sua origem, São Paulo, 2005.

Ordem das cepas	Identificação da cepa	Fonte	Presença do gene <i>sea</i>	Presença de plasmídios
1	2	Manipulador	-	+
2	10	Manipulador	+	+
3	15	Bentô	+	+
4	18	Bentô	-	-
5	21	Peixe	+	-
6	22	Peixe	+	+
7	23	Peixe	+	+
8	26	Queijo	+	+
9	27	Queijo	+	+
10	28	Queijo	+	-
11	29	Queijo	+	+
12	30	Queijo	+	+
13	31	Veiculada por formiga	-	+
14	32	Veiculada por formiga	+	●

Legenda: + presença do gene *sea*; - ausência do gene *sea*; ● teste não realizado

Figura 2 – Gel de eletroforese de cepas de *S. aureus* relacionadas a alimentos, submetidos a PCR para detecção do gene *sea* (480 bp), São Paulo, 2005.

O Quadro 6 mostra, também, a relação entre as cepas confirmadas *S. aureus* por PCR, a presença de plasmídios e do gene *sea*.

Das 13 cepas testadas, 8 (61,5%) apresentavam plasmídios e o gene *sea*, simultaneamente; 2 (15,4%) apresentaram somente plasmídios e 2 (15,4%) apresentaram somente o gene *sea*, sem a presença de plasmídios.

Para todas as cepas, independente da fonte, houve variação em relação à presença de plasmídios e do gene *sea*. Uma cepa de manipulador e uma veiculada por formiga apresentaram somente plasmídio, sem a presença do gene *sea*; 1 cepa recuperada de peixe e 1 de queijo apresentaram o gene *sea* e ausência de plasmídio; e apenas 1 cepa isolada de bento apresentou tanto ausência do gene *sea* como de plasmídio.

4.5 ERIC-PCR

A técnica de ERIC-PCR permitiu observar a diversidade do perfil genético das cepas estudadas. As cepas apresentaram bandas que variaram de 200 bp a 800 bp. As diversas origens e a diferença na cronologia das coletas justificam as variações genéticas encontradas.

A caracterização das cepas por ERIC-PCR evidenciou que todas as cepas apresentaram uma porcentagem de semelhança maior que 84% e que, as cepas de maior similaridade, apresentaram cerca de 90% de semelhança, conforme Figura 3.

Os resultados mostraram 2 grupos de grande similaridade: o grupo 1 formado por 2 cepas, isoladas de peixe; e o grupo 2, formado por uma cepa isolada de manipulador e outra cepa, isolada de bento. Apenas 1 cepa, veiculada por formiga, não apresentou perfil de similaridade muito próximo de qualquer outra, apenas 84%, uma vez que as demais cepas testadas apresentavam porcentagem >84% de similaridade com pelo menos uma cepa. As cepas isoladas de queijos e peixes apresentaram perfis bastante semelhantes.

Figura 3 – Representação gráfica do perfil de similaridade de cepas de *S. aureus*, segundo a fonte de isolamento. São Paulo, 2005.

5. DISCUSSÃO

5.1 Análises microbiológica e bioquímica.

A intoxicação ou toxinfecção estafilocócica foi descrita pela primeira vez em 1894 por J. Denys e posteriormente, em 1914, por M.A. Barber, que se infectou, propositalmente, através da ingestão de leite contaminado com uma cultura de *Staphylococcus aureus* para descobrir quais os sinais e sintomas da doença. A capacidade de algumas cepas causarem toxinfecção alimentar foi provada conclusivamente em 1930 por G. M. Dock et al, que demonstrou que os sintomas podem ser produzidos pela ingestão de culturas de *S. aureus* (JAY 2000).

Um aspecto na investigação de surtos de toxinfecção alimentar é determinar como o alimento envolvido foi contaminado. É sabido que os manipuladores de alimentos são a maior fonte de contaminação por *Staphylococcus* (ARBUTHNOTT e cols 1990, IARIA e cols 1980, UDO e cols 1999).

A alta frequência de manipuladores de alimentos carreadores tem sido identificado por muitos pesquisadores em muitos países, incluindo Brasil (ADESIYUM e cols 1998, IARIA e cols 1980, OLIVEIRA SANTOS e cols 1990), mostrando que 30 a 50% são portadores.

A frequência de *S. aureus* nesta pesquisa, de acordo com os resultados das análises microbiológica e bioquímica, foi de 25,9% e 9,1% na primeira e segunda coletas, respectivamente. Estas porcentagens são bastante inferiores aos valores encontrados na literatura.

Sendo as mãos o veículo de trabalho dos manipuladores, estes podem, através de contato direto com alimento ou com utensílios perpetuar a cadeia epidemiológica da intoxicação alimentar estafilocócica.

WOODROFFE & SHAW (1978) comentaram que o *S. aureus* pode estabelecer-se como bactéria resistente nas mãos de indivíduos que trabalham, persistentemente, em contato com água.

Em estudo conduzido por CARVALHO & SERAFINI (1996), com 44 trabalhadores de uma cozinha industrial, a frequência da bactéria foi de 40,9%, taxa considerada alta. A pesquisa ainda revelou que a porcentagem de portadores nas mãos foi maior para manipuladores do sexo feminino.

NIELSEN (1984) encontrou 14,3% de *S. aureus* nas mãos de manipuladores de alimentos, a frequência mais próxima da presente pesquisa.

RADDI e cols (1988) verificaram que 41,7% de um total de 48 manipuladores eram portadores de *S. aureus* nas mãos. Dentre os manipuladores analisados, 20,8% eram portadores do patógeno nas mãos e fossas nasais, concomitantemente.

Muitos trabalhos dão ênfase à condição dos manipuladores serem portadores de *S. aureus*, independente do local onde a bactéria encontra-se albergada, pois portadores do patógeno em qualquer parte do corpo podem, através das mãos, contaminar alimentos, utensílios e o ambiente. Esse fato pode ser evidenciado quando se observam indivíduos que albergam *Staphylococcus aureus* em fossas nasais, e contaminam, a partir do contato das mãos com as próprias fossas nasais, objetos por ele manuseados.

PEREIRA e cols (1994a) examinaram 55 manipuladores de alimentos saudáveis de uma cozinha industrial de grande porte em Belo Horizonte e encontrou uma porcentagem de 58,2% de portadores, sendo que 30,9% eram carreadores de cepas enterotoxigenicas nas narinas, garganta e região sub-ungueal. CARMO e cols (2003), em trabalho realizado com 5 manipuladores, encontrou 04 portadores (80,0%), estando colonizados por cepas enterotoxigênicas. Em sua pesquisa, IARIA e cols (1980) detectaram índices de 35,3% de portadores em trabalhadores de cozinhas em três hospitais de São Paulo, SP.

5.2 Confirmação da espécie *aureus* por PCR

O diagnóstico das intoxicações estafilocócicas pelo método convencional constitui um processo demorado e que depende da caracterização fenotípica da bactéria cultivada (MASON 2001).

Devido à grande disseminação de *Staphylococcus*, uma vez que esta bactéria é encontrada em todos os ambientes, este gênero tem sido cada vez mais estudado e a acurada e rápida identificação da espécie de *Staphylococcus* torna-se necessária. Para identificar as principais espécies em alimentos, a PCR é o método de escolha por ser rápido e confiável, uma vez que os testes bioquímicos podem não distinguir as espécies com tanta precisão. Até o momento, diversas técnicas utilizando PCR têm sido aplicadas para identificação de espécies de *Staphylococcus*, isoladas de

alimentos, através da utilização de 1 ou 2 pares de primers, identificando somente 1 ou 2 espécies, simultaneamente (CORBIERE MOROT-BIZOT e cols 2004).

SILVA e cols (2000) verificaram que 39,4% das colônias identificadas em ágar *Baird Parker* como *S. aureus* apresentavam características morfológicas atípicas. Além disso, o teste da coagulase, realizado através do API-Staph (BIOMÉRIEUX, FRANCE), revelou variação em relação à intensidade de reação.

Na presente pesquisa, utilizou-se o par de *primers* correspondentes às regiões específicas dos genes 16S rRNA das espécies de *Staphylococcus*, somente para a identificação da espécie *aureus*, substituindo o teste da coagulase em tubo para tal identificação. Os resultados dos testes bioquímicos, bem como, a morfologia, indicaram que 13 cepas pertenciam à espécie *aureus*. Pela técnica de PCR, apenas 2 cepas foram confirmadas como *aureus*, ou seja, somente 15,4% das cepas identificadas bioquímica e morfolologicamente apresentavam o gene específico para a espécie de interesse. Vale lembrar que, estas cepas confirmadas geneticamente como *S. aureus* foram recuperadas na 1ª coleta e pertencem a diferentes manipuladores. Os resultados demonstram, portanto, que a técnica da PCR, por ser de fácil e rápida execução e apresentar alta especificidade, pode ser empregada como ferramenta na triagem de isolados obtidos por métodos convencionais de isolamento e identificação.

Semelhantemente, VIEIRA-DA-MOTTA e cols (2001) utilizaram a técnica de PCR para a verificação da presença do gene da coagulase e, simultaneamente, realizaram o teste da coagulase em tubo e verificaram que, pela técnica de PCR, todas as cepas foram positivas, enquanto que o teste de coagulase mostrou resultados variáveis, demonstrando que a sensibilidade do método molecular é bem maior.

DUIJKEREN e cols (2004) identificaram, entre 10 cepas, 2 (20,0%) como *S. aureus* pela PCR utilizando *primers* da região 16S rRNA, percentual bastante próximo do obtido no presente experimento.

A grande vantagem da utilização de *primers* da região 16S rRNA, é a identificação de diversas espécies do gênero *Staphylococcus*, de acordo com o tamanho dos fragmentos obtidos. ZHANG e cols (2004) identificaram diversas espécies de estafilococos, por esta técnica, com pequenas modificações, para aumentar o poder de detecção das espécies não *aureus*.

O gene que codifica para a produção da enzima coagulase (gene *coa*) tem sido considerado bastante eficiente para o diagnóstico de *S. aureus*, entretanto este gene gera grande polimorfismo entre as espécies, não permitindo a identificação precisa de todas as cepas de *S. aureus* (MARTINEAU e cols 2001).

Diversos genes são pesquisados para a identificação da espécie *S. aureus*, pela PCR. MARTINEAU e cols (2001) compararam as relações filogenéticas de espécies de *Staphylococcus*, obtidas pela análise da sequência 16S rRNA, com os perfis obtidos com a utilização da análise da sequência do gene *tuf* e obtiveram os mesmos resultados, utilizando os 2 pares de *primers* diferentes.

Grande número de pesquisas tem utilizado a técnica denominada Multiplex PCR, na qual se empregam diversos *primers*, identificando, dessa forma, na mesma reação, várias espécies, inclusive genes para produção de toxinas e resistência a antibióticos (KONG e cols 1995, MEHROTRA e cols 2000, MASON e cols 2001, LETERTRE e cols 2003, BLAIOTTA e cols 2004, CORBIERE MOROT-BIZOT e cols 2004, LOVSETH e cols 2004, MARTIN e cols 2004, ZHANG e cols 2004, CADDICK e cols 2005).

5.3 Perfil Plasmidial

A análise de plasmídios está intimamente ligada à pesquisa de genes que codificam fatores de virulência, como toxinas ou resistência a antibióticos (CHAVES e cols 2004, MARTIN e cols 2004, O'BRIEN e cols 2004).

No presente estudo, foram identificados 2 padrões de similaridade na análise do perfil plasmidial (padrão das cepas 22 e 25 e padrão das cepas 29, 30 e 31), entretanto a pesquisa foi realizada somente para identificação da existência de plasmídios, não sendo relacionados com produção de toxinas ou resistência a antibióticos. Do total das cepas confirmadas como *S. aureus* analisadas para a presença de plasmídios, 64,3% (9/14) apresentavam pelo menos 1 plasmídio, sendo que todas apresentavam plasmídios de alto peso molecular. Algumas cepas apresentaram até 5 fragmentos característicos de plasmídios.

MARTIN e cols (2004) encontraram um percentual de 81,2% de cepas, isoladas de surtos de intoxicação estafilocócica, carreadoras de plasmídios, onde todas as cepas

apresentaram pelo menos 2 bandas de diferentes tamanhos e algumas cepas de perfis diferentes, gerados por PFGE, apresentavam perfis plasmidiais semelhantes.

5.4 Identificação de gene para produção da enterotoxina A (SEA)

Nas intoxicações estafilocócicas, a detecção e genotipagem dos genes codificadores para produção de toxinas (*se*) de *S. aureus* isolados de humanos e alimentos é de grande importância. É necessário determinar, rapidamente, o perfil genético das toxinas, nos casos clínicos, e identificar as relações com o alimento suspeito envolvido no surto. Portanto, em investigação epidemiológica de um surto de intoxicação estafilocócica, a genotipagem dos genes *se* representa poderosa ferramenta para a comparação das cepas.

Na presente pesquisa, o percentual da presença do gene para a produção de enterotoxina SEA foi bastante alto (78,6%).

MEHROTRA e cols (2000), em contrapartida, encontraram apenas 19,6% de cepas positivas para a presença do gene *sea*.

Deve-se ressaltar que os métodos moleculares são somente capazes de demonstrar a existência de genes *se* nos microrganismos e não provam se a produção da toxina ocorreu de fato. Para demonstrar a capacidade da cepa produzir uma quantidade de toxina SE suficiente para induzir à intoxicação, métodos para a detecção destas proteínas devem ser desenvolvidos. Os métodos imunológicos utilizados possuem limitadas sensibilidade e especificidade, embora muitos problemas relacionados a isso venham sendo resolvidos através da utilização da técnica de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*). Além disso, a disponibilidade de testes comerciais está restrita à identificação das 5 enterotoxinas clássicas (SEA – SEE), sendo somente experimentais para as demais enterotoxinas (BLAIOTTA e cols 2004).

5.5 Relação entre a presença de plasmídios e presença do gene *sea*

Relata-se que todas as enterotoxinas estafilocócicas são superantígenos codificados por elementos genéticos móveis e, portanto, bastante variáveis, incluindo fagos, plasmídios e as chamadas “ilhas de patogenicidade” (MARTIN e cols 2004).

É evidente, também, que *S. aureus* é uma bactéria bastante susceptível a adquirir resistência a antibióticos, através da transferência de genes de resistência existentes

nos plasmídios. Entretanto, em estudo conduzido por CADDICK e cols (2005), cepas multirresistentes a antibióticos não apresentavam plasmídios e, em contrapartida, todas as cepas não-multirresistentes apresentaram pelo menos 1 plasmídio, sendo que 7 destas possuíam 2 plasmídios e 1 possuía 3 plasmídios diferentes, confirmando que, não necessariamente, a resistência a antibióticos está ligada à presença deste DNA extracromossômico.

No presente experimento, 71,4% das cepas testadas possuíam plasmídios e, concomitantemente, o gene *sea*, que codifica a produção da enterotoxina SEA, relatada como a enterotoxina mais comumente encontrada nos alimentos como causa de intoxicação (LETERTRE 2003a e 2003b). Contudo, 21,4% apresentaram plasmídios, sem demonstrar a presença do gene *sea*, denotando que estes plasmídios podem ser carreadores de genes para outros tipos de fatores de virulência. Em contrapartida, 7,1% das cepas pesquisadas apresentaram somente o gene *sea* e ausência de plasmídios, significando que, a presença do gene *sea* não está vinculada necessariamente à presença do plasmídio, podendo ser encontrado em outro elemento genético e até mesmo no DNA genômico.

5.6 ERIC-PCR

A utilização de técnicas que permitem evidenciar o padrão de bandas (*fingerprinting*) do organismo de interesse, representa um grande avanço na Epidemiologia Molecular, possibilitando, estabelecer correlações clínicas, geográficas e ambientais, sendo, portanto, de fundamental contribuição à Saúde Pública.

Dentre as técnicas de biologia molecular, PFGE é considerada como referência devido ao excelente poder discriminatório e reprodutibilidade, embora as técnicas baseadas em PCR apresentem vantagens como rapidez, baixo custo e fácil execução quando comparadas ao PFGE.

CHIOU e cols (2000), analisando 71 cepas de *S. aureus* recuperadas de 9 surtos de toxinfecção alimentar, obtiveram 22 perfis diferentes por PFGE e 11 perfis por método baseado na PCR.

SHIMIZU e cols (2000) classificaram 129 cepas de *S. aureus*, obtidas de surtos de toxinfecção, em 3 tipos, utilizando a técnica de PFGE.

WEI & CHIOU (2002) compararam padrões de *fingerprinting*, obtidos pela técnica de PFGE e por 3 métodos baseados na PCR, e os resultados do PFGE revelaram 3 perfis diferentes de cepas de *S. aureus*, produtoras de enterotoxinas, enquanto que os métodos baseados na PCR apresentaram baixo poder discriminatório.

ZADOKS e cols (2002) identificaram, por PFGE, 24 tipos e 17 subtipos genéticos de 43 cepas de *S. aureus* isoladas de pele humana e bovina, leite bovino e equipamentos utilizados na produção de leite.

MARTIN e cols (2004) utilizaram PFGE e 2 metodologias baseadas na PCR para obter *fingerprinting* de cepas de *S. aureus*, isoladas de surtos de DTAs, e observaram que as 3 técnicas foram úteis para a diferenciação dos diversos perfis.

Até o momento, poucos estudos têm sido relatados onde a técnica de ERIC-PCR foi utilizada para identificar espécies de *Staphylococcus*.

De acordo com SPERGSE e cols (2003), esta técnica demonstrou ser ferramenta útil para identificação de *S. epidermidis* e sua diferenciação de outras espécies

WIESER & BUSSE (2000), em pesquisa realizada com diversas espécies de *Staphylococcus*, obtiveram padrões de bandas, gerados por ERIC-PCR, com alto grau de similaridade. Esta técnica permitiu ainda a clara diferenciação entre as espécies, dificuldade encontrada com frequência quando da utilização somente de provas bioquímicas de identificação.

No presente estudo, a utilização da ERIC-PCR permitiu a caracterização genotípica das cepas, demonstrando que os perfis de maior similaridade foram encontrados entre cepas recuperadas da mesma fonte. A única cepa recuperada de manipulador apresentou grande semelhança genética com cepa isolada de bento, alimento que sofre grande manipulação.

A caracterização das cepas por ERIC-PCR torna-se ferramenta importante na avaliação da diversidade genética dos isolados, sendo instrumento útil na elucidação de surtos.

6. CONCLUSÕES

- ✓ Do total de manipuladores amostrados, 18,4% (8/49) propiciaram o isolamento de 13 cepas de *S. aureus*, a partir de suas mãos.
- ✓ Dos manipuladores positivos para *S. aureus* nos testes morfológico e bioquímicos, a partir de 1 deles, foram isoladas 6 cepas (46,2% - 6/13).
- ✓ A confirmação da espécie *aureus* pela técnica de PCR, revelou apenas 2 manipuladores positivos, ou seja, 4,1% (2/49).
- ✓ Das cepas isoladas a partir de amostras de alimentos, 62,5% (10/16) foram confirmadas como *S. aureus* pela técnica de PCR.
- ✓ Das cepas veiculadas por formigas, submetidas à técnica de PCR, 100% (2/2) foram identificadas como *S. aureus*.
- ✓ De acordo com os dados obtidos, evidencia-se a necessidade e relevância do treinamento de manipuladores no sentido de atentar para a higienização das mãos, seguindo os preceitos preconizados na legislação vigente.
- ✓ A técnica de PCR deve ser empregada como ferramenta na triagem de isolados obtidos por métodos convencionais de isolamento e identificação, uma vez que revelou a presença de cepas falso-positivas para a espécie *aureus*.
- ✓ A análise do perfil plasmidial permitiu concluir que 64,3% (9/14) das cepas testadas possuíam plasmídeos e 2 grupos de cepas possuíam semelhança em relação ao perfil plasmidial.
- ✓ O percentual para a presença do gene para a produção de enterotoxina SEA foi bastante alto (78,6%).
- ✓ A maior parte das cepas que apresentou plasmídios também apresentou o gene para a enterotoxina SEA, entretanto algumas cepas apresentaram somente plasmídio e 1 cepa apresentou somente o gene sea, evidenciando que nem sempre as duas condições estão vinculadas (presença do gene para enterotoxina e plasmídio).
- ✓ A caracterização das cepas por ERIC-PCR evidenciou que todas as cepas apresentaram uma porcentagem de semelhança maior que 84% e que, as cepas de maior similaridade, apresentaram cerca de 90% de semelhança.

- ✓ A única cepa recuperada de manipulador apresentou grande semelhança genética com cepa isolada de bentô, alimento que sofre grande manipulação.
- ✓ A caracterização das cepas por ERIC-PCR foi importante na avaliação da diversidade genética dos isolados, sendo instrumento útil na elucidação de surtos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Adesiyun AAC, Webb LA, Romain HT. Prevalence and characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bulk and composite milk and cattle handlers. **J. Food Protec** 1998; 61:629-632
2. Almeida RCC, Kuaye AY, Serrano AM, Almeida PF. Avaliação e controle de qualidade microbiológica de mãos de manipuladores de alimentos. **Rev. Saúde Pública** 1995; 29(4): 290-94
3. Almeida TTC. **Padronização e avaliação de métodos moleculares para detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. (Apicomplexa: *Cryptosporiidae*) em amostras fecais: extração de DNA genômico e PCR (reação em cadeia pela polimerase)**. São Paulo; 2004. [Tese de Doutorado - Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo].
4. Almeida Filho ES, Nader Filho A. Ocorrência de *Staphylococcus aureus* em queijo tipo frescal. **Rev. Saúde Pública** 2000; 34 (6): 578-80
5. Andrade GP, Zelante F. Ocorrência simultânea de *Staphylococcus aureus* enterotoxigênicos nas mãos, boca e fezes em portadores assintomáticos. **Rev. Saúde Pública** 1989; 23 (4): 277-84
6. Araújo WP, Iaria ST, Paim GV, Solé Vernin C. *Staphylococcus aureus* em leite cru: caracterização da origem provável, humana ou bovina, das cepas isoladas. **Hora Vet.** 1989a; 9 (49): 11-8
7. Araújo WP, Iaria ST, Paim GV, Solé Vernin C. *Staphylococcus aureus* em leite cru. Contagem, verificação da enterotoxigenicidade e fagotipagem das cepas isoladas. **Rev. Fac. Méd. Vet. Zootec. Universidade de São Paulo** 1989b; 26 (2): 187-98

8. Arbuthnott JP, Coleman DC, Azevedo JS. Staphylococcal toxins. **Human Disease. J. Appl. Bacteriol.** 1990; (Symposium Supplement): 101S-107S
9. Atlas RM, Bartha R. **Microbial ecology, fundamentals and applications.** 3a ed. The Benjamin Cummings Publishing Company Inc; 1993
10. Barkema HW, Schukken YH, Lam TJG, Beiboer ML, Wilmink H, Benedictus G, Brand A. Incidence of clinical mastitis in dairy herds grouped in three categories by bulk milk somatic cell count. **J Dairy Sci.** 1998; 81:411-419
11. Beretta ALRZ, Trabasso P, Stucchi RB, Moretti ML. Use of molecular epidemiology to monitor the nosocomial dissemination of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a University Hospital from 1991 to 2001. **Braz. J. Med. Biolog. Res.**, 2004; 37: 1345-1351
12. Bergdoll MS. *Staphylococcus aureus*. In: Doyle, MP (ed). **Foodborne bacterial pathogens.** INC, New York, 1989. p.463-523.
13. Blaiotta G, Ercolini D, Pennacchia C, Fusco V, Casaburi A, Pepe O, Villani F. PCR detection of Staphylococcal enterotoxin genes in *Staphylococcus* spp strains isolated from meat and dairy products. Evidence for new variants of seG and seI in *Staphylococcus aureus* AB-8802. **J. Appl. Microbiol.** 2004; 97:719-730
14. Bone FJ, Bogie D, Morgan-Jones SC. Staphylococcal food poisoning from sheep milk cheese. **Epidemiol Infect** 1989; 103:449-458
15. Brabes KCS. **Deteção de *Staphylococcus* spp e suas enterotoxinas em leite proveniente de bovinos leiteiros com mastite.** Lavras; 1999. [Tese de Doutorado - Universidade Federal de Lavras]

16. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária de Alimentos – DINAL. Portaria n.451, de 19 de setembro de 1997. Estabelece padrões microbiológicos para produtos expostos a venda ou de alguma forma destinadas ao consumo. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, 22 de setembro de 1997. Seção I, p.21005-21012
17. Brasil. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Resolução – RDC n.12 de 02/01/2001, Regulamento Técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, 10 de janeiro de 2001.
18. Caddick JM, Hilton AC, Rollason J, Lambert PA, Worthington T, Elliott TSJ. Molecular analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* reveals an absence of plasmid DNA in multidrug-resistant isolates. **FEMS Immun. Med. Microbiol.** 2005; 44:297-302
19. Campos M. *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens* e bactérias do gênero. São Paulo; 1980. [Tese de Doutorado em Ciências - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo]
20. Cardoso HFT, Carmo LS, Silva N. Detecção da toxina – 1 da síndrome do choque tóxico em amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de mastite bovina. **Arq Bras Med Vet Zootec.** 2000; 52:7-10
21. Carmo LS, Dias RS, Linardi VR, Sena MJ, Santos DA. An outbreak of staphylococcal food poisoning in the Municipality of Passos, MG, Brazil. **Braz. Arch. Biol. Technol.**, 2003; 46(4): 581-586
22. Carvalho CO, Serafini AB. Grupos de microrganismos isolados da orofaringe, nasofaringe e das mãos dos trabalhadores do restaurante da Universidade Federal de Goiás. **Hig. Alimentar.** 1996; 10(45):19-24

23. Chaves F, Garcia-Martinez J, Miguel S, Otero JR. Molecular characterization of resistance to mupirocin in methicillin-susceptible and –resistant isolates of *Staphylococcus aureus* from nasal samples. **J. Clin. Microbiol.** 2004; 42(2): 822-824
24. Chiou CS, Wei HL, Yang LC. Comparison of pulsed-field gel electrophoresis and coagulase gene restriction profile analysis techniques in the molecular typing of *Staphylococcus aureus*. **J. Clin. Microbiol.** 2000; 38(6): 2186-2190
25. Coombs GW, Nimmo GR, Bell JM, Huygens F, O'Brien FG, Malkowski MJ, Pearson JC, Stephens AJ, Giffard PM and the Australina Group for Antimicrobial Resistance. Genetic diversity among community methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains causing outpatient infections in Australia. **J. Clin. Microbiol.** 2004, 42 (10):4735-4743
26. Corbiere Morot-Bizot S, Talon R, Leroy S. Development of a multiplex PCR for the identification of *Staphylococcus* genus and four staphylococci species isolated from food. **J. Appl. Microbiol.** 2004; 97:1087-1094
27. Corrêa MS. **As práticas e concepções de higiene pessoal - determinantes do treinamento de manipuladores de alimentos de um restaurante industrial** [online]. Disponível em <URL: <http://www.nutline.enut.ufop.br/artigos/artigo03/artigo03.html>
28. Crisley FD & Foter MJ. The use of antimicrobial soaps and detergents for hand washing in foodservice establishments. **J Milk Food Technol.** 1965; 28:278-84
29. Crossley KB. The staphylococci in human disease. 1997. New York: Churchill Livingstone

30. Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. **Clin. Microbiol. Rev.**. 2000; 13(1):16-34
31. Duijkeren E, Box ATA, Heck MEOC, Wannet WJB, Fluit AC. Methicillin-resistant staphylococci isolated from animals. **Vet. Microbiol.** 2004; 103:91-97
32. Eaton AD, Clesceri LS, Greenberg, AE. **Standard Methods**. 19ª edição. APHA - American Public Health Association, 1995
33. Fagundes H, Oliveira CAF. Infecções intramamárias causadas por *Staphylococcus aureus* e suas implicações em saúde pública. **Ciência Rural**. 2004; 34(4):1315-1320
34. Forsythe SJ. **Microbiologia da segurança alimentar**. Porto Alegre: Artmed, 2002a. Doenças de origem alimentar; p.65-108
35. Forsythe SJ. **Microbiologia da segurança alimentar**. Porto Alegre: Artmed, 2002b. Microrganismos causadores de doenças de origem alimentar; p.155-204
36. Furnalettto SMP, Nader Filho A, Wilson D, Schokem Iturrino RP. *Staphylococcus aureus* enterotoxigênicos isolados a partir de leite de vacas mastíticas. **Rev. Microbiol.** 1987; 18 (2):138-43
37. Genigeorgis C. Present state of knowledge on staphylococcal enterotoxin. **Int. J. Food Microbiol.** 1989; 9:327-360
38. Germano MIS. **Treinamento de manipuladores de alimentos: fator de segurança alimentar e promoção da saúde**. São Paulo: Varela; 2003a. Em que se define treinamento e salienta-se sua importância para a segurança alimentar; p. 53-55.

39. Germano MIS. **Treinamento de manipuladores de alimentos: fator de segurança alimentar e promoção da saúde**. São Paulo: Varela; 2003b. Em que se fazem algumas considerações a título de conclusão, salientando a importância do treinamento de manipuladores para a segurança alimentar; p. 159-161.
40. Germano MIS. **Promoção da saúde: desafio para os profissionais envolvidos no treinamento de manipuladores de alimentos**. São Paulo; 2002. [Tese de Livre Doutorado Faculdade de Saúde Pública da USP].
41. Germano PML & Germano MIS. **Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos**. 2ª ed. São Paulo: Livraria Varela, 2003a. Agentes bacterianos de toxinfecções; p. 215-276
42. Germano PML & Germano MIS. **Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos**. 2ª ed. São Paulo: Livraria Varela, 2003b. Características fundamentais dos alimentos; p. 39-78
43. Germano PML & Germano MIS. **Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos**. 2ª ed. São Paulo: Livraria Varela, 2003c. Qualidade das matérias-primas; p.19-38
44. Gonzalez RN, Jasper DE, Farver TB, Bushnell RB, Franti CE. Prevalence of udder infections and mastitis in 50 California dairy herds. **J Am Vet Med Assoc**. 1988; 193:323-328
45. Hein, I; Lehner, A; Rieck, P; Klein, K; Brandi, E; Wagner, M. Comparison of different approaches to quantify *Staphylococcus aureus* cell by real time quantitative PCR and application of this technique for examination of cheese. **Appl Environ Microbiol**. 2001; 67(7):3122-3126

46. Iaria ST, Furllanetto SMP, Campos MLC. Pesquisa de *Staphylococcus aureus* enterotoxigenico nas fossas nasais de manipuladores de alimentos em hospitais. **Rev. Saúde Publica**. 1980; 14:93-100
47. Jay JM. Staphylococcal Gastroenteritis. **Modern Food Microbiology**. Aspen Publishers Inc. Gaithersburg Maryland: 2000. p.441-459
48. Kong RYC, Dung WF, Vrijmoed LPP, Wu RSS. Co-detection of three species of water-borne bacteria by multiplex-PCR. **Mar. Poll. Bulletin** 1995; 31(4-12): 317-324
49. Letertre C, Perelle S, Dilasser F, Fach P. A strategy based on 5' nuclease multiplex PCR to detect enterotoxin genes *sea* to *sej* of *Staphylococcus aureus*. **Mol. and Cell. Probes**. 2003a; 17:227-235
50. Letertre C, Perelle S, Dilasser F, Fach P. Detection and genotyping by real-time PCR of the staphylococcal enterotoxin genes *sea* to *sej*. **Mol. Cell. Probes**. 2003b; 17:139-147
51. Loureiro MM, Moraes BA, Quadra MRR, Pinheiro GS, Suffys PN, Asensi MD. Molecular epidemiology of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolated from newborns in a hospital in Rio de Janeiro, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. 2000; 95(6):777-782
52. Lovseth A, Loncarevic S, Berdal KG. Modified multiplex PCR method for detection of pyrogenic exotoxin genes in Staphylococcal isolates. **J. Clin. Microbiol**. 2004: 3869-3872
53. Ludwig W, Dorn S, Springer N, Kirchhof G, Schleifer KH. PCR – based preparations of 23S rRNA – targeted group – specific polynucleotide probes. **Appl Environ Microbiol** 1994; 60(9):3236-44.

54. Mariano, FA e cols. Cepas de *Staphylococcus* spp. enterotoxigênicos isolados de leite caprino. Isolamento e identificação automatizada de cepas de *Staphylococcus* spp. enterotoxigênicos oriundos de leite caprino. In: **Encontro de Iniciação Científica**; 2002, Campos dos Goytacazes: Universidade Estadual do Norte Fluminense, RJ. Anais.
55. Martin MC, Fueyo JM, Gonzalez-Hevia MA, Mendonza MC. Genetic procedures for identification of enterotoxigenic strains of *Staphylococcus aureus* from three food poisoning outbreaks. **Int. J. Food Microbiol.** 2004; 94:279-286.
56. Martineau F, Picard FJ, Ke D, Paradis S, Roy PH, Oullette M, Bergeron MG. Development of a PCR assay for identification of Staphylococci at genus and species levels. **J Clin Microbiol.** 2001; 39(7):2541–2547.
57. Mason WJ, Blevins JS, Beenken K, Wibowo N, Ojha N, Smeltzer MS. Multiplex PCR protocol for the diagnosis of staphylococcal infection. **J Clin Microbiol** 2001; 39(9):3332-3338.
58. Masud T, Ali AM, Shah MA. Enterotoxigenicity of *Staphylococcus aureus* isolated from dairy products. **Aust J Dairy Technol.** 1993; 48:30-32
59. Matte GR. **Estudo de *Vibrio* spp. potencialmente patogênicos através de métodos moleculares.** São Paulo; 2003. [Tese de Livre-Docência - Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo]
60. Matte MH. **Aplicação de métodos moleculares no estudo de organismos do gênero *Aeromonas*.** São Paulo; 2004. [Tese de Livre-Docência - Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo]
61. Mead PS, Slutsker L, Dietz V. et al. Food-related illness and death in the United States. **Emerg. Infect. Dis.** 1999; 5:607-25

62. Mehrotra M, Wang G, Johnson WM. Multiplex PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1 and methicillin resistance. **J Clin Microbiol** 2000; 38(3):1032-1035
63. Millian SJ. Studies on incidence of coagulase positive staphylococci in a normal unconfined population. **Amer. J. Public Health.** 1960; 50:791-798
64. Morse SI. Staphylococci. In: **Microbiology.** 3 ed. Ed. B. D. Davis, Philadelphia, Harper International Edition, 1980. p. 624
65. Neto AC, Silva CGM, Stamford TLM. *Staphylococcus* enterotoxigênicos em alimentos in natura e processados no Estado de Pernambuco, Brasil. **Cienc. Tecnol. Aliment.**, 2002; 22(3): 263-271
66. Nielsen EMF. ***Staphylococcus aureus* no vestibulo nasal, garganta e mãos de manipuladores de alimentos de cozinhas comerciais. Produção de enterotoxina estafilocócica e fagotipagem a partir de cepas isoladas.** São Paulo; 1984. [Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo]
67. O'Brien FG, Lim TT, Chong FN, Coombs GW, Enright MC, Robinson DA, Monk A, Said-Salim B, Kreiswirth BN, Grubb WB. Diversity among community isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Australia. **J Clin Microbiol.** 2004; 42(7):3185-3190
68. Oliveira Santos B, Aguillar M, Tanaka OMU. Behavior of *Staphylococcus aureus* strains from simultaneous áreas of healthy carriers working in different nursing category in a general teaching hospital. **Rev. Microbiol.** 1990; 21:309-310

69. Passos MHCR, Kuaye AY. Avaliação dos surtos de enfermidades transmitidas por alimentos comprovados laboratorialmente no município de Campinas – SP, no período de 1987 a 1993. **Rev Inst Adolfo Lutz**. 1996; 56(1):77–82
70. Pedro SCM. Avaliação da qualidade higiênico-sanitária dos locais de venda e de amostras de queijo Minas meia cura, comercializado na cidade de São Paulo. São Paulo, 2003. [Tese de Mestrado - Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo]
71. Pereira ML, Carmo LS, Pereira JL. Comportamento de estafilococos coagulase negativos pauciprodutores de enterotoxinas em alimentos experimentalmente inoculados. **Cienc Tecnol Aliment**. 2001; 21:171-175
72. Pereira ML, Carmo LS, Santos EJ, Bergdoll MS. Staphylococcal food poisoning from cream-filled cake in a metropolitan area of south-eastern Brazil. **Rev Saúde Pública**. 1994; 28(6):406-9
73. Pereira ML, Pereira JL, Serrano AM, Bergdoll MS. Enterotoxinas estafilocócicas: importância e métodos analíticos de detecção. **Hig. Alimentar**. 1999; 13(64):24-31.
74. Raddi MAG, Leite CQF, Mendonça CP. *Staphylococcus aureus*: portadores entre manipuladores de alimentos. **Rev Saúde Pública**. 1988; 22 (1): 36-40
75. Relman DA. Emerging infections and newly-recognised pathogens. **Netherlands J Med** 1997; 50:216-220.
76. Rosec JP e cols. Enterotoxin production by staphylococci isolated from foods in France. **Int J Food Microbiol**. 1997; 35:213-221

77. Scarcelli E; Piatti R. Patógenos emergentes relacionados à contaminação de alimentos de origem animal. Divulgação técnica. **Biológico**. 2002; 64(2):123-127
78. Schwartz DC, Cantor CR. Separation of yeast chromosome-sized DNA by pulsed field gradient gel electrophoresis. **Cell** 1984; 37:67-75.
79. Shimizu A, Fujita M, Igarashi H, Takagi M, Nagase N, Sasaki A, Kawano. Characterization of *Staphylococcus aureus* coagulase type VII isolates from staphylococcal food poisoning outbreaks (1980-1995) in Tokyo, Japan, by by pulsed-field gel electrophoresis. **J. Clin. Microbiol.** 2000; 38(10): 3746-3749
80. Silva N, Junqueira VCA, Silveira NFA. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo: Livraria Varela; 1997.
81. Silva WP, Destro MT, Landgraf M, Franco BDGM. Biochemical characteristics of typical and atypical *Staphylococcus aureus* in mastitic milk and environmental samples of brazilian dairy farms. **Braz. J. Microbiol.** 2000; 31(2): 103-106
82. Singh DV, Matte MH, Matte GR, Jiang S, Sabeena F, Shukla BN, Sanyal SC, Huq A, Colwell RR. Molecular analysis of *Vibrio cholerae* O1, O139, non-O1 and non-O139 strains: clonal relationships between clinical and environmental isolates. **Appl Environ Microbiol** 2001; 67:910-21.
83. Sischo WM, Heider LE, Miller GY, Moore DA. Prevalence of contagious pathogens of bovine mastitis and use of mastitis control practices. **J Am Vet Med Assoc**. 1993; 202:595-600
84. Speck ML. **Compendium of methods for microbiological examination of foods**. Washington, USA: APHA – American Public Health Association; 1976.

85. Spargser J, Wieser M, Taubel M, Rosseló-Mora RA, Rosengarten R, Busse H-J. *Staphylococcus nepalensis* sp nov., isolated from goats of the Himalayan region. **Int J Syst Evol Microbiol**. 2003; 53:2007-2011
86. Struelens MJ, Bauernfeind A, VanBelkum A, Blane D, Cookson BD, Dijksoorn L, El Solh N, Etienne J, Garaizar J, Gerner-Smidt P, Legakis N, De Lencastre H, Nicolas MH, Pitt TL, Romling U, Rosdahi V, Witte W. Consensus guidelines for appropriate use and evaluation of microbial epidemiologic typing systems. **Clin Microbiol Infect** 1996; 2(1):21-31.
87. Trindade PA, McCulloch JÁ, Oliveira GA, Mamizuka EM. Molecular techniques for MRSA typing: current issues and perspectives. **Braz J Infect Dis** 2003; 7(1): 32-43.
88. Udo EE, Al-Bustan MA, Jacob LE, Chught TD. Enterotoxin production by coagulase-negative staphylococci in restaurant workers from Kuwait City may be a potencial cause of food poisoning. **J. Med. Microbiol**. 1999; 48:819-823
89. Valle J. e cols. Enterotoxin production by staphylococci isolated from healthy goats. **Appl Envirom Microbiol** 1990; 56:1323-1326
90. Versalovic J, Koeuth T, Lupski JR. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic Acids Res** 1991;19:6823-31.
91. Vieira-da-Motta O, Folly MM, Sakyama CCH. Detection of different *Staphylococcus aureus* strains in bovine milk from subclinical mastitis using PCR and routine techniques. **Braz J Microbiol** 2001; 32: 27-31

92. Warren DK, Liao RS, Merz LR, Eveland M, Dunne Jr WM. Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* directly from nasal swab specimens by a real time PCR assay. **J Clin Microbiol** 2004; 42(12): 5578-5581
93. Wei HL & Chiou CS. Molecular subtyping of *Staphylococcus aureus* from an outbreak associated with a food handler. **Epidemiol Infect** 2002; 128:15-20.
94. Welsh J, McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Res** 1990; 18:7213-8.
95. Wieser M & Busse H-J. Rapid identification of *Staphylococcus epidermidis*. **Int J Syst Evolut Microbiol.** 2000; 50:1087-1093
96. Williams JG, Kubelik AR, Livak KJ e cols. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are usefull genetic markers. **Nucleic Acid Res** 1990; 18:6531-5.
97. Zadoks RN, Leeuwen WB, Kreft D, Fox LK, Barkema HW, Schukken YH, Belkum A. Comparison of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine and human skin, milking equipment, and bovine milk by phage typing, pulsed-field gel electrophoresis, and binary typing. **J. Clin. Microbiol.** 2002; 40(11): 3894-3902
98. Zanardi, AMP. **Avaliação da qualidade microbiológica de refeições servidas a bordo de aeronaves.** São Paulo, 2002. [Tese de Doutorado - Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo]
99. Zecconi A, Hahn G. *Staphylococcus aureus* in raw milk and human health risk. **Bulletin of IDF**, 2000; 345: 15-18

100. Zhang K, Sparling J, Chow BL, Elsayed S, Hussain Z, Church DL, Gregson DB, Louie T, Conly JM. New quadriplex PCR assay for detection of methicillin and mupirocin resistance and simultaneous discrimination of *Staphylococcus aureus* from coagulase-negative staphylococci. **J Clin Microbiol** 2004; 42(11): 4947-4955

ANEXO I
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, _____,
concordo em participar do projeto “Caracterização genotípica de cepas de *Staphylococcus aureus* recuperadas de alimentos , mãos de manipuladores de alimentos e veiculadas por formigas”, sob a responsabilidade de Elaine Cristina de Mattos e seu orientador Pedro M. L. Germano, desde que garantido o sigilo e privacidade das informações, reservando, entretanto, o direito de recusar-me a participar ou retirar meu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem que haja aplicação de penalidade.

Declaro ter sido esclarecido sobre os objetivos, métodos e procedimentos utilizados no referido estudo, descritos abaixo:

Justificativa e os objetivos da pesquisa: O presente trabalho visa demonstrar a presença de *Staphylococcus aureus* nas mãos dos manipuladores de alimentos de uma cozinha industrial e caracterizar as diferentes linhagens encontradas através de métodos moleculares.

Especificações dos procedimentos: Serão realizadas duas coletas de material de todos os manipuladores que trabalham na cozinha industrial, dentro de um intervalo de trinta dias. Cada coleta será realizada da seguinte forma: de cada manipulador será coletado 02 (dois) suabes de mãos (um antes da higienização de mãos e outro imediatamente antes da próxima higienização coletiva de mãos) pelo pesquisador responsável.

São Paulo, _____ de _____ de 2004

Elaine Cristina de Mattos
Rua Teffé, 152 – Bairro Santa Maria
São Caetano do Sul – SP
CEP 09560-140
e-mail: ecmattos@usp.br

Colaborador