

## ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE *Staphylococcus* COAGULASE POSITIVA COLETADOS EM AMBIENTE DE ORDENHA.

JULIANA FERNANDES ROSA<sup>1</sup>; GREYCE SILVEIRA MELLO<sup>2</sup>; HELENICE DE LIMA GONZALEZ<sup>3</sup>; FRANCIELI DELL'OSBEL<sup>4</sup>; NATACHA DEBONI CERESER<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – ju\_fernandes.r@hotmail.com

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – greycemello@gmail.com

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – helenicegonzalez@hotmail.com

<sup>4</sup>Universidade Federal de Pelotas – fran\_dellosbel@hotmail.com

<sup>5</sup>Universidade Federal de Pelotas – natachacereser@yahoo.com.br

### 1. INTRODUÇÃO

O leite é um alimento rico em nutrientes como proteínas, carboidratos, gorduras, vitaminas e sais minerais, sendo completo para as faixas etárias mais predispostas à doenças, como idosos e convalescentes (GUERREIRO et al., 2005; SANDA et al., 2013).

Contudo, o leite é um produto altamente perecível, sendo suscetível à ação de micro-organismos contaminantes, principalmente quando sua obtenção e manipulação são realizadas sob condições higiêncio-sanitárias ineficientes, o que pode comprometer as suas características físicas, químicas e biológicas, tornando seu consumo um risco para a população (NERO et al., 2003; WARMINSKA-RADYK et al., 2003).

Sendo as bactérias da espécie *Staphylococcus aureus* micro-organismos comensais das fossas nasais, pele e intestino de humanos e animais, estas, por sua natureza, propagam-se facilmente, utilizando-se desses reservatórios naturais como forma de veiculação para diferentes ambientes, até mesmo para os alimentos (KONEMAN, et al., 2008; RAPINI et al., 2004). A ingestão de leite e derivados contaminados por *Staphylococcus aureus* é o comportamento de risco responsável pelo desenvolvimento de casos e de surtos de intoxicação alimentar, devido à capacidade destes de produzir enterotoxinas, presentes na maioria das cepas desta espécie de estafilococos (GANDRA, 2003).

A PCR (reação da polimerase em cadeia) é uma técnica molecular de utilização para o diagnóstico microbiológico, inclusive em alimentos (ZSCHÖCK et al., 2005). A multiplex PCR (mPCR) é uma variação da PCR convencional, onde utilizam-se mais de um par de *primers* na mesma reação, o que possibilita a amplificação de mais de uma sequência de DNA de forma simultânea, possibilitando que mais de uma espécie bacteriana seja identificada na mesma PCR, tornando esta uma análise mais ampla, rápida e barata (PHUERKTES et al., 2001; GANDRA, 2006).

Sabendo disso, o objetivo do trabalho foi realizar a identificação molecular de isolados de *Staphylococcus* coagulase positiva obtidos de amostras de leite cru e da pele dos tetos de vacas em ordenha.

### 2. METODOLOGIA

As amostras utilizadas para o estudo foram anteriormente coletadas em cinco diferentes unidades produtoras de leite da região sul do Rio Grande do Sul, e o critério de utilização dos isolados de *Staphylococcus* para a identificação molecular do gênero foi a verificação da produção da enzima coagulase.

Previamente, para as amostras coletadas dos tetos dos animais durante a ordenha, foram utilizadas zaragatoas estéreis friccionadas em uma área

delimitada de 12 cm<sup>2</sup> do teto, e após, estas foram depositadas em 12 mL de água peptonada tamponada 0,1%. Já o leite cru foi homogeneizado e coletado em um frasco estéril direto dos tanques de expansão com o auxílio de uma concha estéril, e após as coletas, as amostras foram analisadas conforme metodologia descrita pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2003), no Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal da Universidade Federal de Pelotas (LIPOA/UFPeL).

Após as devidas sementeiras, foi realizada a prova da coagulase livre para a observação da coagulação do inóculo, e depois da confirmação dos isolados como *Staphylococcus* coagulase positiva, os mesmos foram estocados em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) adicionado de 20% de Glicerol, à -20°C.

Para o presente estudo, foram selecionados 13 isolados de *Staphylococcus* coagulase positiva, sendo cinco amostras da pele dos tetos e oito de leite cru, que após a recuperação em BHI, tiveram o seu DNA extraído conforme a metodologia de SAMBROOK & RUSSEL (2001), e a identificação das espécies *S. aureus*, *S. intermedium* e *S. hyicus* foi feita através de análise do DNA dos isolados através de multiplex PCR, onde pesquisou-se a presença do gene *nuc* com o uso dos *primers* representados na Tabela 1.

Tabela 1 - *Primers* utilizados na identificação das espécies de *Staphylococcus*.

Primer	Sequência (5' a 3')	Gene alvo	Tamanho da amplificação (pb)	Espécie
au-F3	TCGCTTGCTATGATTGTGG	<i>nuc</i>	359	<i>S. aureus</i>
au-nucR	GCCAATGTTCTACCATAGC			
in-F	CATGTTCATATTATTGCGAATGA	<i>nuc</i>	430	<i>S. intermedium</i>
in-R3	AGGACCATCACCATTGACATATTGAAACC			
hy-F1	CATTATATGATTTGAACGTG	<i>nuc</i>	793	<i>S. hyicus</i>
hy-R1	GAATCAATATCGTAAAGTTGC			

Também foi utilizado o protocolo relatado por TAKASHI et al. (2010). Cada reação de 50 µL continha 2 µL de DNA extraído, 2U de *Taq* DNA polimerase, 10 pmol de cada *primer*, 0,2 nM de desoxinucleosídeo trifosfato (dNTP) e tampão de reação. A amplificação foi realizada a 95°C por 2 minutos, 30 ciclos de 95°C por 30 segundos, 56°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto, e extensão final a 72°C por 2 minutos, e os produtos da PCR foram visualizados em eletroforese em gel de agarose a 1%.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 13 amostras de *Staphylococcus* coagulase positiva utilizadas no estudo, todas elas (100%) apresentaram resultados compatíveis com *Staphylococcus aureus* de acordo com a técnica multiplex PCR.

Semelhante a tais resultados, BORGES et al. (2008) isolaram *Staphylococcus* coagulase positiva em 20 amostras de leite cru oriundos de tanques de expansão, e foi verificada a prevalência de *Staphylococcus aureus* em 80% dos isolados em detrimento às demais espécies coagulase positiva testadas (10% *S. intermedium* e 10% *S. hyicus*). Também, LAMAITA et al. (2005), identificaram prevalência de 71% de *Staphylococcus aureus* nas 38 amostras coletadas de tanques de expansão identificados como coagulase positiva.

Esses altos índices de contaminação do leite cru por *Staphylococcus aureus* evidenciada no estudo, podem estar relacionados à grande prevalência desse micro-organismo no ambiente de ordenha, tanto como contaminante da superfície

dos equipamentos e utensílios, quanto como causador de mastite nos rebanhos (PHILPOT & NICKERSON, 2000).

Levando em conta a elevada capacidade de produção de enterotoxinas termoresistentes pelo *Staphylococcus aureus*, e seu constante envolvimento em surtos de intoxicações alimentares (OMOE et al., 2005), cuidados com as boas práticas de produção relacionados à limpeza e sanitização dos equipamentos, dos manipuladores e do ambiente de ordenha devem ser observados (BELOTI et al., 2015; FREIRAS et al., 2004), afim de prevenir a contaminação do leite desde a sua obtenção.

#### 4. CONCLUSÕES

O *Staphylococcus aureus* foi a única espécie de *Staphylococcus* coagulase positiva isolada nas amostras de leite cru e da pele dos tetos das vacas analisadas, o que demonstra a importância do controle e monitorização desse agente para sanidade e qualidade do leite.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BELOTI, V.; TAMANINI, R.; NERO, L. A.; MOREIRA, M. A. S.; SILVA, L. C. C.; FAGNANI, R.; REIS, K. T. M. G.; **Leite: obtenção, inspeção e qualidade**. Londrina: Editora Planta, 2015, 417 p.

BORGES, M.F.; NASSU, R.T.; PEREIRA, J.L.; ANDRADE, A.P.C.; KUAYE, A.Y. Perfil de contaminação por *Staphylococcus* e suas enterotoxinas e monitorização das condições de higiene em uma linha de produção de queijo de coalho. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.5, p.1431-1438, 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água: Instrução Normativa nº 62, de 26/08/2003. **Diário Oficial da União**, Brasília. Seção I, p. 14-51. 2003.

FREIRAS, M. F. L. et al. Exotoxinas Estafilocócicas. **Ciênc. Vet. Tróp.** Recife-PE, v. 7, n. 2 e 3, p. 63-74, 2004.

GANDRA, E.A. **Identificação de *Staphylococcus aureus*, *S. intermedius* e *S. hyicus* através de testes bioquímicos e da amplificação por PCR de sequências dos genes *coa* e *nuc***. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Pelotas, 2003.

GANDRA, E.A. **Multiplex PCR para detecção de *Staphylococcus aureus*, *S. intermedius* e *S. hyicus* em leite UHT artificialmente contaminado**. Tese (Doutorado Ciência e Tecnologia agroindustrial) - Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Pelotas, 2006.

GUERREIRO, P.K.; MACHADO, M.R.F.; BRAGA, G. C.; GASPARINO, E.; FRANZENER, A.S.M. Qualidade microbiológica de leite em função de técnicas

profiláticas no manejo de produção. **Ciênc. Agrotec.** Lavras, v. 29, n. 1, p. 216 - 222, 2005.

KONEMAN, E.W.; STEPHEN, A.D.; JANDA, W.M., SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN, W.C. **Diagnóstico Microbiológico**. Texto e Atlas Colorido. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

LAMAITA, H.C. Contagem de *Staphylococcus* sp. e detecção de enterotoxinas estafilocócicas e toxina da síndrome do choque tóxico em amostras de leite cru refrigerado. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária de Zootecnia**, Belo Horizonte, v.57, n.5, p.702-709, 2005.

NERO, L.A.; MAZIERO, D.; BEZERRA, M.M.S. Hábitos alimentares do consumidor de leite cru de Campo Mourão, Pr. Semina: **Ciências Agrárias**. v. 24, n. 1, 2003.

OMOE, K. et al. Comprehensive analysis of classical and newly described staphylococcal superantigenic toxin genes in *Staphylococcus aureus* isolates. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.246, n.2, p.191-198, 2005.

PHILPOT, W.N.; NICKERSON, S.C. Vencendo a luta contra a mastite. Naperville, IL: **Westfalia, Surge Ing**, 2000. 192p.

PHUEKTES, P.; MANSELL, P.D.; BROWNING, G.F. Multiplex Polymerase Chain Reaction assay for simultaneous detection of *Staphylococcus aureus* and Streptococcal causes of bovine mastitis. **J Dairy Sci.**, v. 84, p. 1140-1148, 2001.

RAPINI, L.S.; TEIXEIRA, J.P.; MARTINS, N.E. Perfil de resistência antimicrobiana de cepas de *Staphylococcus* sp. isoladas de queijo tipo coalho. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 56, p. 130-133, 2004.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 3ªed. Nova York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SANDA, A.C.M.M.; SILVA, T.L.; PIVA, K.P.; SANDA, R.T.; ORSINE, J.V.C. Características do leite cru consumido pela população de Pires do Rio – GO. **Revista HCPA**, Urutaí, v. 33, n. 2, p. 127 – 134. 2013.

TAKASHI, S.; TSUBAKISHITA, S.; TANAKA, Y.; SAKUSABE, A.; OHTSUKA, M.; HIROTAKI, S.; KAWAKAMI, T.; FUKATA, T.; HIRAMATSU, K. Multiplex-PCR method for species identification of coagulase-positive *Staphylococci*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 3, p. 765-769, 2010.

WARMINSKA-RADYK, I.; ŁANIEWSKA-TROKENHEIM, L. MIKS, M. Microbiological contamination of vegetable salads. **Polish Journal of Natural Sciences**, v. 22, p. 733-741, 2007.

ZSCHÖCK, M.; MANHOLD-MAURER, S.; WESCHER, A. Evaluation of tRNA intergenic spacer length polymorphism analysis as a molecular method for species identification of streptococcal isolates from bovine mastitis. **J.Dairy Sci.**, v. 72, p. 333- 337, 2005.