TERMORRESISTÊNCIA E SENSIBILIDADE A ANTIBIÓTICOS E QUIMIOTERÁPICOS DE CEPAS DE S. aureus ISOLADOS DE MATERIAIS ENVOLVIDOS EM INTOXICAÇÃO POR ENTEROTOXINA ESTAFILOCÓCICA, NO ESTADO DE SÃO PAULO*

DILMA S.GELLI**
ELIANA G.A.RIBEIRO***
MARINA REIGOTA PACHECO****
ARACELIS M.FREITAS*****
MARIA REGINA R.ESPER*****
BEATRIZ PISANI*****
MARILU M.M.ROCHA*****
ALICE Y.TANAKA*****
MARIA TOSHIKO F.CASTRO*****
MITUKA KAKU*****

Foram realizados testes de termorresistência e teste de sensibilidade aos antibióticos e quimioterápicos em 22 cepas de S. aureus isoladas de eventos de doenças veiculadas por alimentos. Das 5 cepas isoladas de carne, uma apresentou resistência a penicilina/kanamicina/tetraciclina, outra cepa para penicilina/tetraciclina e as demais apenas para penicilina. Das doze cepas isoladas de bolo, três apresentaram resistência para penicilina/ácido nalidíxico, penicilina/kanamicina e penicilina/polimixina B, outras seis somente para penicilina e as demais sensíveis para todos os agentes testados. Uma cepa isolada de farofa apresentou resistência a penicilina/kanamicina. Das duas cepas isoladas de produtos de confeitaria, uma apresentou resistência dupla penicilina/sulfame toxazol-trimetoprim e a outra sensível a todos os agentes testados. Das duas cepas isoladas de nasofaringe de manipuladores de alimentos, uma foi resistente a ampicilina/penicilina e a outra a fosfomicina. O teste de termorresistência de 25 cepas mostrou que 5 (20%) estavam viáveis imediatamente após a exposição a 68°C por 10 minutos. Dos tubos negativos, após a incubação foram ainda recuperadas 5 cepas (20%).

* Trabalho realizado nos laboratórios de Microbiologia Alimentar do Instituto Adolfo Lutz Central e Regionais.

** Laboratório Central
*** Regional de Ribeirão Preto
**** Regional de Sorocaba
***** Regional de Presidente Prudente
***** Regional de Campinas
***** Regional de Bauru
***** Regional de Santos
***** Regional de São José do Rio Preto

1 INTRODUÇÃO

As doenças transmitidas por alimentos (DTA) são reconhecidamente importantes, tanto pelo agravo à saúde como pela demanda de recursos gastos com atendimento médico, hospitalar e medicamentos, pela perda de força de trabalho e pela inutilização dos alimentos contaminados.

A ocorrência destas doenças é de interesse sanitário e epidemiológico. Nos países do Hemisfério Norte, esta ocorrência é avaliada, inclusive estatisticamente. Assim, de 1981 a 1984, cerca de 3% das DTA por agentes bacterianos, na Inglaterra e País de Gales, foram por Staphylococcus aureus (4). No Canadá, entre 1978 a 1979, foram relatados 44 surtos por essa etiologia e, nos Estados Unidos, de 1969 a 1973, 30% dos surtos foram por esse agente (5, 10, 13). Entretanto, a incidência total de surtos de intoxicação por enterotoxina estafilocócica, não é conhecida, uma vez que muitos países não realizam, ou realizam incompletamente, esse levantamento.

No Brasil, as informações a esse respeito são escassas. Entretanto, indicações disponíveis revelam que as intoxicações estafilocócicas são de incidência alta. Na cidade de São Paulo, esta etiologia é responsável por 25% das DTA de origem bacteriana (6, 8, 10, 11, 12).

As intoxicações por enterotoxina estafilocócica ocorrem por causa da produção e liberação dessa toxina durante o desenvolvimento do S. aureus nos produtos alimentícios. Assim, o controle das DTA tem dois pontos críticos fundamentais, quais sejam, a introdução de células viáveis de S. aureus no produto alimentício e a sua multiplicação, até quantidade compatível de enterotoxina estafilocócica, capaz de desencadear a doença no comensal. Quando o número de células viáveis de cepas produtoras de enterotoxina é maior ou igual a 10^5 /g ou ml do produto alimentício, desencadeiam-se os sintomas de intoxicação por enterotoxina estafilocócica no comensal.

O S. aureus é largamente disseminado no ambiente, sendo o homem um dos seus principais reservatórios. Por isso, é frequentemente encontrado em ambientes onde alimentos são manipulados (2). No homem, o S. aureus pode estar presente na região nasofaríngea, nas mãos (rachaduras, cortes, queimaduras, etc), na pele em geral e na microbiota intestinal.

Para sua multiplicação, o S. aureus precisa de condições que o favoreçam, como pH, umidade, nutrientes básicos e temperatura adequada. Em condições ótimas, dá origem a uma nova geração em cerca de 20 minutos. Os processos de obtenção de alimentos que possam inibir ou inativar biologicamente a cepa de S. aureus são as condições contrárias àquelas que favorecem a sua multiplicação. A higiene dos alimentos deve considerar estas condições para que possa exercer controle adequado.

A inativação das células viáveis e da enterotoxina é diferente. A enterotoxina é mais resistente aos agentes inativadores do que as células viáveis.

A termorresistência (1, 7, 9) é importante característica dessa enterotoxina estafilocócica, sendo influenciada pelo pH, população bacteriana, composição do meio em que ocorre o aquecimento, presença de água, gordura, cloretos, açúcares, proteínas, idade da bactéria e temperatura ótima de crescimento. Por isso, o cozimento, a pasteurização e outras formas usuais de aquecimento dos alimentos não inativam completamente a enterotoxina estafilocócica (1, 9).

Quando as células viáveis de estafilococos são expostas à temperatura subletal, uma proporção substancial dos sobreviventes adquire sensibilidade a meios contendo NaCl 7,5%. Lesões fisiológicas à célula bacteriana, que possam ser produzidas durante esse processo incluem perda da membrana citoplasmática, degradação do ribossoma e alteração da capacidade celular. Essas lesões são reversíveis e durante o processo de regeneração a atividade predominante se relaciona aos ribossomas.

Em caso de isolamento de números significativos de células viáveis de S. aureus em produtos envolvidos em surtos de DTA por esse agente, pode-se concluir que não ocorreu a "inativação irreversível" de células presentes ou que ocorreu a introdução do S. aureus após o tratamento de obtenção do produto alimentício em questão (7).

Os dados epidemiológicos obtidos dos surtos precisam de complementação laboratorial para avaliação ampla dos surtos e suas causas. Esta complementação está baseada no tipo de enterotoxina presente no produto, origem e procedência das cepas que o produzem, com identificação por fagotipagem das cepas isoladas, testes de sensibilidade/resistência a antibióticos e quimioterápicos, sorotipagem, etc (9).

A variação de comportamento das cepas encontradas em surtos, em relação aos fatores usados para inativá-las tem importância para a higiene de alimentos, uma vez que a resistência a temperatura, por exemplo, não é idêntica para todas as cepas.

O presente levantamento teve por objetivo avaliar a sensibilidade/resistência aos antibióticos e quimioterápicos, bem como a resistência térmica de cepas de S. aureus isoladas de produtos alimentícios envolvidos em surtos de intoxicação estafilocócica.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostras

Foram utilizadas cepas de S. aureus isoladas de alimentos responsáveis por surtos de intoxicações, clínica e laboratorialmente confirmados, tendo como agente causal a enterotoxina estafilocócica, sendo 23 cepas isoladas de alimentos e 2 cepas isoladas de nasofaringe de manipuladores.

As cepas são procedentes de:

- . Campinas (sete) - três de carnes, duas de bolo, uma de coxinha e uma de salsicha;
- . Sorocaba (sete) - cinco de bolo e duas de nasofaringe de mani-

puladores;

- . Ribeirão Preto (seis) - três de bolo, uma de carne, uma de creme de morango e uma de queijo;
- . Bauru (duas) - uma de farofa e uma de arroz;
- . Presidente Prudente (uma), de bolo;
- . São José do Rio Preto (uma), de bolo;
- . São Paulo (uma), de bolo.

2.2 Manutenção da cepa e preparo do inóculo

As cepas foram mantidas em ágar padrão e conservadas em geladeira. Os inóculos foram feitos com caldo BHI e inoculados a 35°C por 12 horas.

2.3 Teste de sensibilidade aos antibióticos e quimioterápicos

O método utilizado foi o de Kirby-Bauer em placas com ágar Mueller-Hinton e os discos impregnados com antibióticos utilizados foram da Laborclin.

2.4 Teste de termorresistência

Foi adicionado 0,5 ml de inóculo em BHI, de cada amostra, em seis tubos contendo 9 ml de leite desnatado estéril. Os tubos foram expostos a 68°C durante 0, 2, 4, 6, 8 e 10 minutos em banho-maria (5).

Imediatamente antes e ao final de cada tempo de exposição foi retirado um tubo para proceder-se à contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) em ágar padrão, usando-se diluições seriadas em solução salina peptonada (SSP) a 0,1%. Todos os tubos de leite desnatado usados na exposição foram mantidos a 35°C por 24 horas e 48 horas.

Após a contagem das unidades formadoras de colônias, procedeu-se a semeadura por estrias em ágar Baird-Parker, incubadas a 35°C por 48 horas, para confirmação do *S. aureus* e para verificação de sua possível viabilidade, no caso dos tubos que não apresentaram formação de colônias, quando semeados em ágar padrão (3).

3 RESULTADOS

Os resultados obtidos estão expressos na Tabela 1, onde constam a procedência das cepas, os antibióticos e quimioterápicos, suas sensibilidade e resistência.

A termorresistência apresentada pelas cepas, está indicada nos Gráficos 1, 2, 3 e 4.

TABELA 1 - PERCENTAGEM DE RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS E QUIMIOTERÁPICOS DE S. aureus ISOLADOS DE EVENTOS DE DOENÇAS VEICULADAS POR ALIMENTOS

ORIGEM DAS CEPAS ANTIB. E QUIMIOTERÁPICOS	CARNE		BOLO		FAROFÁ		PRODUTOS DE CONFITEARIA		SECREÇÃO DE OROFARINGE	
	5*	12	1	2	1	2	1	2	1	2
Ácido Nalidíxico	0**	8,3	0	0	0	0	0	0	0	0
Ampicilina	0	0	0	0	0	0	0	0	50,0	0
Carbenicilina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cefalotina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cloranfenicol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Eritromicina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fosfomicina	0	0	0	0	0	0	0	0	50,0	0
Gentamicina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kanamicina	20,0	8,3	100,0	0	0	0	0	0	0	0
Nitrofurantoina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Penicilina	100,0	75,0	100,0	50,0	0	0	0	0	50,0	0
Polimixina B	0	8,3	0	0	0	0	0	0	0	0
Rifampicina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sulfametoxazol-Trimetoprim	0	0	0	50,0	0	0	0	0	0	0
Tetraciclina	40,0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Vancomicina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

*Número de cepas testadas **% de resistência

GRÁFICO 1 - SENSIBILIDADE TÉRMICA DE CEPAS DE *S. aureus* ISOLADAS DE ALIMENTOS CÁRNEOS ENVOLVIDOS EM INTOXICAÇÕES ES-TAFILOCÓCICAS

GRÁFICO 2 - SENSIBILIDADE TÉRMICA DE CEPAS DE *S. aureus* ISOLADAS DE AMOSTRAS DE BOLOS ENVOLVIDOS EM INTOXICAÇÕES ES-TAFILOCÓCICAS

GRÁFICO 3 - SENSIBILIDADE TÉRMICA DE CEPAS DE *S. aureus* ISOLADAS DE AMOSTRAS DE BOLOS ENVOLVIDAS EM INTOXICAÇÕES ES-TAFILOCÓCICAS

GRÁFICO 4 - SENSIBILIDADE TÉRMICA DE CEPAS DE *S. aureus* ISOLADAS DE AMOSTRAS DE DIVERSOS ALIMENTOS ENVOLVIDOS EM INTOXICAÇÕES ESTAFILOCÓCICAS

4 DISCUSSÃO

As 22 cepas testadas foram agrupadas de acordo com a espécie do produto de onde foram isoladas e apresentaram resistência acumulada da seguinte maneira: das cinco cepas isoladas de carne, uma apresentou resistência tripla (Kanamicina, Penicilina, Tetraciclina); outra dupla (Penicilina, Tetraciclina) e as demais, simples (Penicilina). Das doze cepas isoladas de bolo, três apresentaram resistência dupla (Ácido nalidíxico, Penicilina); (Penicilina, Kanamicina); (Penicilina, Polimixina B); seis simples (Penicilina) e as demais não apresentaram resistência a nenhum antibiótico. A cepa de farofa apresentou resistência dupla (Penicilina, Kanamicina). Os produtos de confeitaria apresentaram uma cepa com resistência dupla (Penicilina, Sulfametoxazol-Trimetoprim) e uma sem resistência. Das duas cepas de nasofaringe de manipuladores, uma apresentou resistência dupla (Ampicilina, Penicilina) e outra simples (Fosfomicina) conforme a Tabela 1. Observação: o bolo 10 e o bolo 11 foram preparados pelos manipuladores dos quais se isolaram da nasofaringe a cepa 19 e a cepa 20.

Com relação a termorresistência de cepas de *S. aureus*, os dados obtidos revelam que das 25 cepas isoladas de alimentos, 5 (20%) mostraram-se viáveis imediatamente após a exposição a 68°C por 10 minutos. As cepas isoladas de nasofaringe foram inibidas após exposição por 4 a 6 minutos. A incubação posterior dos tubos negativos revela recuperação de 5 (20%) cepas. Observou-se que, com relação às duas cepas isoladas de nasofaringe, expostas a 68°C por 10 minutos não ocorreu nenhuma recuperação. Apenas uma delas foi recuperada após exposição a 68°C por 8 minutos.

5 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos, pode-se concluir que:

As cepas testadas mostraram acentuada sensibilidade aos antibióticos e quimioterápicos, ou seja, 18,1% sensíveis a todos os agentes usados no teste, uma cepa com resistência tripla e sete com resistência dupla. Nenhuma cepa mostrou resistência a Rifampicina, Cefalotina, Carbenicilina, Nitrofurantoina, Vancomicina, Eritromicina, Gentamicina e Cloranfenicol, tendo a maioria apresentado resistência a Penicilina.

O teste de sensibilidade/resistência das cepas produtoras de enterotoxina não é um marcador epidemiológico significativo, pois não mostra padrão de resistência aos antibióticos e quimioterápicos testados. Entretanto, pelo resultado obtido de cepa isolada de nasofaringe do manipulador (19) pode-se dizer que a cepa de *S. aureus* encontrada no bolo 11 não teve esta via de procedência.

Quando analisado o comportamento das cepas com relação a termorresistência nota-se que estas foram injuriadas fisiologicamente, porém não destruídas. Os resultados sugerem ainda que a termorresistência de cepas de *S. aureus* envolvidas em surtos de intoxicação estafilocócica não é homogênea e que, em substrato contendo leite o tratamento térmico usado pode não ser suficiente para sua destruição.

Abstract

Twenty-two S. aureus strain isolated from food-borne diseases, were tested to evaluate their thermo-resistance and antimicrobial susceptibility. Among five strains from meat origin, one was resistant to Penicillin G, Kanamycin and to Tetracycline; another strain was resistant to Penicillin G and to Tetracycline and three were resistant to Penicillin G only. Analysis of twelve strains isolated from cake demonstrated one resistant to Penicillin G and to Nalidixic acid, one resistant to Penicillin G and to Kanamycin and another resistant to Penicillin G and to Polimyxin B. Six strains were resistant to Penicillin G only and three were susceptible to all tested agents. One strain isolated from farofa was resistant to Penicillin G and to Kanamycin. Concerning the confectionary products, one strain isolated was resistant to Penicillin G and to Sulfamethoxazole-trimethoprim, and another one was susceptible to all the antimicrobials. Among two food-handlers' nasopharynx isolated, one, strain was resistant to Ampicillin and to Penicillin G, and the other one showed resistance to Phosphomycin. The thermo-resistance testing of twenty-five strains showed that five of them (20%) were viable when tested immediately after being exposed to 68°C for ten minutes. Recovery of five strains (20%) was achieved after incubation of negative tubes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 01 BANWART, G.J. Basic food microbiology. New York : Van Nostrand Reinhold, 1989. p. 203-701.
- 02 BRANDRES, J.C., MATHEWSON, J.J., DUPONT, H.J. Heat susceptibility of bacterial enteropathogens. Arch. Inter. Med., Chicago, v. 148, p. 2261-63, May 1988.
- 03 GELLI, D.S. Crescimento e termorresistência da Yersinia enterocolítica sorotipo O3. R. Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, v. 42, n. 1/2, p. 9-12, 1982.
- 04 HOBBS, B.C., ROBERTS, D. Food poisoning and food hygiene. 5.ed. Londres : Edward Arnould, 1987. 372 p.
- 05 HOLMBERG, S.G., BLAKE, P.A. Staphylococcal food poisoning in the United States. JAMA, Chicago, v. 251, n. 4, p. 487-9, 1984.
- 06 DOENÇAS veiculadas por alimentos (DVA's). Informe Técnico VISA/SEMAB, v. 7, p. 4-5, 1990.
- 07 JAY, M.J. Modern food microbiology. New York : Van Nostrand Reinhold, 1970. p. 151-62.
- 08 KARINO, E.H. et al. Relato de um surto de intoxicação alimentar por Staphylococcus aureus, em Paranavaí (PR). Hig. Alimentar, São Paulo, v. 4, p. 102-5, 1985.
- 09 MINNOR, T.E., MARTH, E.H. Staphylococci and their significance in food. New York : Elsevier, 1976. p. 44-217.
- 10 SABIONE, J.G., HIROOKA, E.Y., SOUZA, M.L.R. Intoxicação alimentar por queijo Minas contaminado com Staphylococcus aureus. R. Saude Publ., São Paulo, v. 22, n. 5, p. 458-61, 1988.

- 11 SALZBERG, S.P., MASSAGUER, P.R., SERRANO, A.M. Estudo epidemiológico e microbiológico de um surto de intoxicação alimentar. R.Microbiol., São Paulo, v. 13, n. 1, p. 26-30, jan./mar.1982.
- 12 SANTOS, E.C., GENIGEORGIS, C., FARVER, R.B. Prevalence of Staphylococcus aureus in raw and pasteurized milk used for commercial manufacturing of Brazilian Minas cheese. J.Food Prot., Ames-Iowa, v. 44, p. 172-6, Mar.1981.
- 13 TODD, E.C.D. Foodborne and waterborne disease in Canada 1979: annual summary. J.Food Prot., Ames-Iowa, v. 48, p. 1071-8, 1985.