**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO POTENCIAL TOXIGÊNICO DE** *Staphylococcus aureus* **ISOLADOS DE FILÉ DE PEITO DE FRANGO CONGELADO**

**OLIVEIRA**, Jônatas Fernandes[[1]](#footnote-0); **RIBEIRO JÚNIOR**, José Carlos[[2]](#footnote-1)

**RESUMO**

*Staphylococcus aureus* é um dos principais agentes bacterianos envolvidos em casos de intoxicação alimentar. Assim, este trabalho teve por objetivo verificar a presença desse microrganismo em filés de peito de frango congelado, e caracterizar o potencial toxigênico por PCR. Foram avaliadas 20 amostras provenientes de supermercados em Araguaína, Tocantins. As contagens de *S. aureus* variaram de 0 a 18 UFC/mL para o total de amostras, com média de 5,85 UFC/mL. A PCR, do total de 117 isolados recuperados, foi possível observar a presença de 15 isolados positivos (12,82%) para o gene da produção das enterotoxinas (*se*), sendo 1 (0,85%) caso para a *sec*, 1 (0,85%) caso para o gene *sed* e 13 (11,11%) casos para *see*. O gene da síntese da toxina do choque tóxico (TSST-1) foi detectado em 6 (5,13%). Os resultados demonstram que houveram falhas na manipulação do produto e com inclusão de cepas enterotoxigênicas, que determinam necessidade de reforçar a importância de medidas profiláticas higiênico-sanitárias para controlar esse agente em alimentos e revisão dos programas de autocontrole para melhoria da qualidade higiênica da manipulação.

**Palavras-chave**: Genes toxigênicos, manipulação dos alimentos e PCR.

1. **INTRODUÇÃO/JUSTIFICATIVA**

Este trabalho aborda a caracterização molecular do potencial patogênico de *Staphylococcus aureus* isolados de filé de peito de frango congelados, tanto pela análise microbiológica quanto pela avaliação da segurança dos alimentos, evidenciando o potencial risco de se consumir esse alimento se contaminado. O estudo tem a microbiologia como área de conhecimento primária e a inspeção de produtos de origem animal como área secundária. As atividades desenvolvidas neste projeto foram de suma importância para evidenciar a problemática da contaminação de filé de frango por *S. aureus,* apontando possíveis falhas no processo de produção do alimento.Consequentemente, as ações desenvolvidas neste trabalho serão relevantes para melhorar as condições higiênico-sanitárias da cadeia produtiva desse produto. A relevância deste trabalho, dá-se pela formação acadêmica e o preparo para o mercado de trabalho. Os resultados são importantes para detectar falhas e, assim, buscar melhorias.

1. **BASE TEÓRICA**

*S. aureus* é um importante micro-organismo patogênico em alimentos, principalmente relacionado com manipulação inadequada (NASCIMENTO, 2000; MIRANDA et al., 2022). Como são bactérias que colonizam as superfícies externas da epiderme humana, quando presente em alimentos processados, indicam falhas higiênico-sanitárias durante a manipulação do produto (YOON et al., 2022).

A presença desse micro-organismo em elevadas contagens pode predispor o consumidor ao risco de intoxicação estafilocócica (FORSYTHE, 2000). Filés de peito de frango são produtos intensamente manipulados na cadeia produtiva, predispondo esse tipo de produto a sofrer grande contaminação estafilocócica ocasionalmente por micro-organismos capazes de sintetizar toxinas (LIMA, 2022).

1. **OBJETIVOS**

Determinar as contagens de *S. aureus* em filés de peito de frango regularmente produzidos e comercializados no norte do Tocantins, recuperando os isolados sugestivos e caracterizando-os, por abordagem molecular, em relação à sua capacidade de produção de toxinas estafilocócicas.

1. **METODOLOGIA**

Foram avaliadas 20 amostras de filé de peito de frango regularmente inspecionados e congelados a -20ºC, com validade dentro do prazo, provenientes de supermercados em Araguaína, Tocantins. As amostras foram coletadas e analisadas no período de setembro de 2023 a agosto de 2024.

As amostras, com o peso de aproximadamente 1kg cada, foram mantidas em suas embalagens originais e transportadas refrigeradas ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos (LabMA) da Universidade do Norte do Tocantins (UFNT), campus Araguaína, para análise imediata.

 A pesquisa quantitativa de *Staphylococcus aureus* foi realizada inicialmente com a retirada de 25g do filé de peito de frango de forma asséptica e representativamente do total da amostra. Em seguida, essas frações das amostras foram colocadas em sacos plásticos do tipo Bag, com 225 mL de água peptonada tamponada (H20p). Esses materiais foram encaminhados para o *Stomacher* para serem homogeneizados durante 180 segundos. Após esse processo, das alíquotas iniciais diluídas em H20p (10 -1) foram feitas microdiluições seriadas em solução salina (0,85%) peptonada (0,001%) até a diluição 10 -9.

As diluições seriadas foram inoculadas em placas Compact Dry ® XSA (Nissui Pharmaceutical Co., Ltd., Tokyo, Japão), seguindo as recomendações do fabricante, e incubadas a 35 ± 1ºC por 48 horas. Considerava-se as colônias na coloração azul para a quantificação do *S. aureus*. Na primeira amostra analisada, ou seja, a amostra piloto, determinou-se que a diluição (10 -1) foi possível fazer a contagem de forma adequada das colônias típicas de *S. aureus*. Assim, as demais amostras foram inoculadas nessa diluição, com margem de erro até a diluição 10-3.

De cada amostra, em que foi possível observar isolados sugestivos, foram cultivados em caldo cérebro-coração (BHI). Esses isolados foram então utilizados para extração de DNA genômico (gDNA) conforme descrito por Ribeiro Júnior et al. Os produtos finais obtidos nesse processo foram submetidos à reação em cadeia da polimerase (PCR) com o objetivo de identificar genes que codificam as seguintes toxinas: toxinas estafilocócicas de A a E (*sea* a *see*), toxina da síndrome do choque tóxico (*tst*) e as toxinas esfoliativas A e B (*eta* e *etb*).

As PCRs foram realizadas em dois ensaios multiplex para cada isolado, utilizando a seguinte composição: aproximadamente 50 ng de DNA molde, 100 nM de cada dNTP, 2,5 U de *Platinum Taq DNA Polymerase* (Invitrogen, Carlsbad, CA) e água ultrapura para completar o volume final de 25 μL. Os *primers*, condições de amplificação e produtos gerados foram conforme descrito por Mehrotra et al. (2000).

A amplificação foi realizada em um termociclador (Bio Rad). Após a amplificação, os produtos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2%, corados em solução de brometo de etídio a 20mg/L por 20 minutos, e documentados sob luz ultravioleta.

1. **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Entre as 20 amostras avaliadas, as contagens de *Staphylococcus aureus* nas amostras apresentam média de 5,85 UFC/ml, com valores variando de 0 a 18 UFC/ml e um desvio padrão de 5,5 UFC/ml. Foram isoladas 117 colônias típicas de *S. aureus*. Para a identificação do potencial genético em sintetizar toxinas, utilizou-se a técnica de PCR. Esses dados confirmados pela PCR podem ser observados na Tabela 1.

**Tabela 1.** Quantificações de *Staphylococcus aureus* em 20 amostras de filé de peito de frango (F1 a F20) e potencial genético dos isolados para produção de toxinas estafilocócicas.

| **Amostras** | **Isolados** | **Positivos (n)** |
| --- | --- | --- |
| FI | 4 |  *sec* (1), *sed* (1) e *see* (2) |
| F2 - F6 | 39 | - |
| F7 | 17 | *tst* (1) e *see* (8) |
| F8 - 10 | 15 | - |
| F11 | 18 | *see* (3) |
| F12 | 8 | *tst* (5) |
| F13 - F20 | 16 | - |
| Total | 117 | 21 (17,95%) |

Fonte: Arquivo Pessoal

Com base nos dados obtidos pela técnica de PCR, identificou-se a presença de *S. aureus* com o gene para a enterotoxinas em 15 isolados (12,82%), sendo 1 (0,85%) caso para a *sec*. 1 (0,85%) caso para *sed* e 13 (11,11%) casos para *see*. Isso evidencia o perigo do consumo desse alimento, tendo em vista que *S. aureus* que possui a capacidade genética de sintetizar a enterotoxina (*se*) é amplamente conhecida como um importante agente responsável por intoxicação alimentar em seres humanos (LAMAITA et al., 2005). Não identificou-se casos para as toxinas *sea* e *seb*. O gene da síntese da toxina do choque tóxico (TSST-1) foi detectada em 6 (5,13%) dos isoladas. Alimentos que contém essa toxina, embora ainda não estejam relacionados à síndrome do choque tóxico, podem ser uma fonte de disseminação dessa doença para os seres humanos (SENA, 2000). Não foram identificados a presença do gene da toxina esfoliativa A e B nos isolados. Essas toxinas são responsáveis pela síndrome estafilocócica da pele escaldada (MELISH, 1971; HAYAKAWA et al., 1998).

1. **CONCLUSÃO/CONSIDERAÇÕES FINAIS**

A quantificação de *S. aureus* em alimentos apresentou resultados baixos e em conformidade com a legislação. Porém, dentre os isolados, observou-se a presença de bactérias com potencial gênico para causar intoxicação estafilocócica. Portanto, é necessário a tomada de medidas profiláticas que busquem reduzir a contaminação do alimento.

1. **REFERÊNCIAS**

FORSYTHE, Stephen. **Microbiologia da segurança alimentar.** Porto Alegre: Artmed, 424 p., 2000.

HAYAKAWA, Y. et al. Production of Exfoliative Toxin A by *Staphylococcus aureus* Isolated from Mastitic Cow’s Milk and Farm Bulk Milk. **Journal of Veterinary Medicine Science**, Tokyo, v. 60, n. 11, p. 1281-1283, 1998.

HENNEKINNE, Jacques-Antoine; BUYSER, Marie-Laure; DRAGACCI, Sylviane. *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. **FEMS** **Microbiology Reviews**. v.36, n.4, p.815-836, 2012.

LAMAITA, Henrique et al. Contagem de *Staphylococcus sp*. e detecção de enterotoxinas estafilocócicas e toxina da síndrome do choque tóxico em amostras de leite cru refrigerado. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**., v.57, p.702- 709, 2005.

LIMA, Michelle. **Revisão de literatura: resistência microbiana em carne de frango no Brasil** (Bachelor’s thesis, Universidade Tecnológica Federal do Paraná), 2022. Disponível em: <https://riut.utfpr.edu.br/jspui/handle/1/30421>, Acesso em 22 de maio de 2023.

MIRANDA, Juliana et al. Prevalence, Biofilm Formation, and Antimicrobial Resistance of *Escherichia coli, Staphylococcus aureus*, and *Salmonella* Isolates from Goat Meat Marketed in Petrolina, Brazil. **Food Protection Trends**, v. 42, n. 2, p. 139-150, 2022.

MEHROTRA, Manisha; WANG, Gehua; JOHNSON, Wendy. Multiplex PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1, and methicillin resistance. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 3, p. 1032-1035, 2000.

MELISH, Mary. Staphylococcal scalded skin syndrome: the expanded clinical syndrome. **Journal of Pediatrics**, St. Louis, v. 78, p. 958-967, 1971.

NASCIMENTO, Francisco. Aspectos sócio econômicos das doenças veiculadas pelos alimentos. **Nutrição em Pauta**, v. 40, p. 22-26, 2000.

RIBEIRO JÚNIOR, José et al. Efficiency of boiling and four other methods for genomic DNA extraction of deteriorating spore-forming bacteria from milk. **Semina Ciências Agrárias**, v. 7, p. 3069–3078, 2016.

SENA, Maria. **Perfil epidemiológico, resistência a antibióticos e aos conservantes nisina e sistema de lactoperoxidase de *Staphylococcus* spp. isolados de queijos coalho comercializados em Recife** 2000. 75f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

YOON, Sunghyun et at.. Molecular Typing, Antibiotic Resistance and Enterotoxin Gene Profiles of Staphylococcus aureus Isolated from Humans in South Korea. **Microorganisms**, v. 10, p. 3-42, 2022.

1. **AGRADECIMENTOS**

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq – Brasil pelo apoio da concessão da bolsa.

1. Bolsista do Programa de Iniciação Científica (PIBIC). Universidade Federal do Norte do Tocantins (UFNT), Centro de Ciências Agrárias. jonatas.oliveira@ufnt.edu.br [↑](#footnote-ref-0)
2. Professor Doutor da Universidade Federal do Norte do Tocantins (UFNT), Orientador do projeto de Iniciação Científica. jose.carlos@ufnt.edu.br [↑](#footnote-ref-1)