

STAPHYLOCOCCUS AUREUS PRODUTOR DE TERMONUCLEASE EM ALIMENTOS *

Dilma Scala GELII **
Maria Conceição MARTINS **

RIALA6/617

GELII, D.S. & MARTINS, M.C. — *Staphylococcus aureus* produtor de termonuclease em alimentos. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 46(1/2):103-109, 1986.

RESUMO: Foram testadas, quanto à produção de desoxirribonuclease (DNase) e termonuclease (TNase), 382 cepas de *Staphylococcus aureus*, isoladas de 205 amostras de alimentos, separadas em grupos como segue: grupo a, 236 cepas isoladas de 158 amostras de alimentos não-causadores de enfermidades e, grupo b, 146 cepas isoladas de 47 amostras de alimentos recebidas para elucidação do agente causador de intoxicação alimentar, com sintomas clínicos nos afetados compatíveis aos causados pela enterotoxina estafilocócica. Considerando os resultados obtidos, no caso do grupo a, observou-se a presença de cepa não-produtora de DNase e TNase em amostra de macarrão e cepas produtoras de DNase mas não de TNase provenientes de leite em pó e bife frito, não sendo portanto 100% concordantes os resultados referentes à produção de DNase e TNase; no grupo b, verificou-se que todas as cepas demonstraram produção de DNase e TNase.

DESCRITORES: *Staphylococcus aureus* em alimento, termonuclease.

INTRODUÇÃO

Staphylococcus aureus é uma bactéria que pode ocorrer na flora da pele e mucosa do homem e de outros animais de sangue quente, ou como agente de processos infecciosos¹. Sua presença em alimentos é devida à manipulação e/ou processamento inadequado(s). Muitas cepas de *S. aureus*, ao se multiplicarem, produzem e liberam enterotoxina estafilocócica^{5, 11}, que é causa de intoxicações alimentares que afetam o homem, gatos jovens e primatas^{4, 22, 27}. Surto epidêmicos de enfermidades transmitidas por alimentos a ela atribuídos quase sempre ocorrem quando a quantidade de enterotoxina no alimento ultrapassa o limite de resistência do consumidor, desencadeando os sintomas da doença: vômito, diarreia, ânsia, calafrios, dores abdominais, prostração e, raramente, febre^{3, 4, 5, 10, 12, 15, 22, 23}.

Segundo o "Center for Disease Control", a enfermidade causada por esta enterotoxina, nos Estados Unidos, em 1982, foi responsável por 12,7% de todas as doenças transmitidas por alimentos, incluindo-se as de origem bacteriana, química, parasitária e viral¹³.

A multiplicação do *S. aureus* e a produção e liberação de enterotoxina por cepas produtoras estão associadas¹¹. Se o número de unidade formadora de colônias (u.f.c.) desta bactéria por g (ml) do produto for pequeno, pode tratar-se de contaminação recente ou de produto que apresenta características inadequadas para a sua multiplicação. Em condições favoráveis, verifica-se que a presença de *S. aureus* ao redor de 10^5 u.f.c./g (ml) do produto está associada à liberação de enterotoxina em quantidade capaz de afetar o consumidor, desde que a cepa em questão seja capaz de produzi-la.

As enterotoxinas estafilocócicas^{3, 4, 5, 8}, designadas pelas letras A, B, C, D e E²⁸,

* Realizado na Seção de Microbiologia Alimentar do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP.

** Do Instituto Adolfo Lutz.

podem ser detectadas a partir do alimento, porém, as antienterotoxinas não estão disponíveis facilmente em nosso meio, seja pelo custo elevado, ou pela escassez e raridade. Os animais sensíveis a esta toxina, macacos e gatos jovens^{4, 22, 27}, também não são fáceis de ser adquiridos e/ou mantidos em laboratório. Entretanto, as enterotoxinas não são os únicos metabólitos que podem ser extraídos do substrato onde o *S. aureus* se desenvolveu. Enzimas, em especial as que atuam sobre o ácido desoxirribonucleico, como a desoxirribonuclease (DNase) e a termonuclease (TNase), também estão presentes^{2, 11, 16, 18, 21, 25, 29, 31}.

O teste de DNase é usado sistematicamente para identificação de *S. aureus*, juntamente com o teste de coagulase. Verifica-se, na rotina, a produção de coagulase; caso não seja francamente positiva, realizam-se DNase^{1, 2, 7, 28} e outros testes, como fosfatase, fermentação e oxidação da glicose e do manitol, tendo sempre por base as características morfológicas e tintoriais da bactéria^{1, 3, 9, 20, 22, 28, 30}.

Já foi estabelecido o valor da TNase para a confirmação e identificação do *S. aureus*^{1, 3, 30}. No que se refere à análise de alimentos, verificou-se que a sua detecção direta é possível quando o produto apresenta um número de células ao redor de 10^5 u.f.c./g (ml), valor este compatível com o número necessário de células para produção de enterotoxina em quantidade suficiente para desencadear doença^{11, 17, 24}. É importante ressaltar que tanto a TNase como a enterotoxina são termotáveis, permanecendo, portanto, no alimento mesmo após a destruição das células que as produziram^{14, 19, 29}.

Os critérios laboratoriais usados para confirmar qual o alimento veiculador da enterotoxina estafilocócica incluem: detecção da presença de enterotoxina no alimento, presença de um número de *S. aureus* maior ou igual a 10^5 u.f.c./g (ml) do produto e caracterização da cepa isolada quanto à produção de enterotoxina e termonuclease^{29, 21}.

A técnica de detecção da TNase é relativamente simples e barata em contraposição à da pesquisa de enterotoxina²⁹.

O presente estudo tem por finalidade a verificação da produção de TNase e DNase de cepas de *S. aureus* isoladas de alimentos e caracterizadas pelos testes de coagulase e oxidação/fermentação da glicose, além da confirmação microscópica da morfologia e coloração da bactéria. Dentre os alimentos estão incluídos os que foram considerados veiculadores de enterotoxina estafilocócica, por terem sido responsáveis por enfermidades transmitidas por alimentos com apresentação de sintomas clínicos, nos afetados, compatíveis com a síndrome por ela provocada, e os que não estavam envolvidos em surtos de enfermidades transmitidas por alimentos.

MATERIAL E MÉTODOS

Material

Cepas — Foram testadas 382 cepas recentemente isoladas ou mantidas sob conservação, procedentes da análise de alimentos. Estas foram separadas em grupos, sendo: *grupo a*, provenientes de amostras não-envolvidas em surtos de enfermidades transmitidas por alimentos, como segue: massas alimentícias com ou sem recheio, queijo e soro de queijo, leite, canjica, sorvete e pós para sorvete, pães e produtos de panificação, bolos, doces de confeitaria e bolachas, carnes cruas e embutidos, carnes prontas e alimentos preparados com carnes, alimentos preparados com cereais e derivados, alimentos preparados (diversos), salgadinhos e sanduíches; *grupo b*, provenientes de amostras envolvidas em surtos de enfermidades transmitidas por alimentos, com a mesma sintomatologia clínica, nos afetados, causada pela enterotoxina estafilocócica, através de bolos e doces de confeitaria, queijo, carnes prontas e pratos preparados com carnes, pratos preparados com cereais e derivados e salgadinhos. (tabelas 1 e 2.)

Amostras — Foram avaliadas no presente trabalho 205 amostras de alimentos, entre as recebidas para análise, por apresentarem u.f.c. de *S. aureus*. Constam do *grupo a*, aquelas que apresentaram número de u.f.c. inferior a 10^5 /g (ml) ou que não foram recebidas para elucidação de surtos de enfermidades transmitidas por alimentos; e, no *grupo b*, as que, além de apresentarem número de u.f.c. igual ou maior que 10^5 /g (ml), foram recebidas para elucidação do agente causador de enfermidades transmitidas por alimentos.

As amostras de alimentos foram distribuídas pela requisição do exame, como segue: 13 foram recebidas da fiscalização da alimentação pública, 47 foram solicitadas para elucidação do agente, devido a ocorrência de surtos de enfermidades transmitidas por alimentos, 18 foram enviadas para análise exigida para fins de registro do alimento junto à Divisão Nacional de Alimentos do Ministério da Saúde e 127 foram solicitadas pelo interessado para verificação da qualidade higiênico-sanitária de seus produtos.

Métodos

Isolamento de S. aureus — O isolamento foi efetuado pelas técnicas do número mais provável e da semeadura em placas³⁰. Principalmente no caso de alimento envolvido em surto de enfermidade transmitida por alimentos, foram testadas cepas isoladas das diferentes diluições.

Caracterização de S. aureus — A caracterização foi efetuada baseada na verificação microscópica e produção de catalase e coagulase, oxidação e fermentação da glicose,

TABELA 1

Valores de unidade formadora de colônias (u.f.c.) de *S. aureus* e resultados dos testes de desoxirribonuclease e de termonuclease obtidos na análise de alimentos e cepas não-envolvidos em casos de intoxicação alimentar

Amostras de alimentos analisados		Valores de u.f.c. por g (ml) do produto			Cepas de <i>S. aureus</i> testadas			
Tipo	Total	Mínimo	Máximo	Total	Teste de DNase		Teste de TNase	
					Positivas	Negativas	Positivas	Negativas
Massa alimentícia com ou sem recheio	27	0,62	7,5x10 ⁴	35	34	1	34	1 *
Queijo e soro de queijo	18	1,9	3,0x10 ⁴	31	31	0	31	0
Leite	21	0,36	3,0x10 ⁴	31	31	0	30	1 **
Canjica	2	2,4x10 ²	4,6x10 ²	3	3	0	3	0
Sorvete e pós para sorvete	5	5,5x10 ³	3,2x10 ⁴	5	5	0	5	0
Pães e produtos de panificação	6	0,9	3,0x10 ⁴	8	8	0	8	0
Bolos, doces de confeitaria	8	2,3	3,0x10 ⁴	12	12	0	12	0
Carnes cruas e embutidas	13	0,36	3,4x10 ⁵	23	23	0	23	0
Carnes prontas e alimentos preparados com carne	31	0,3	6,0x10 ⁴	51	51	0	50	1 ***
Alimentos preparados com cereais e derivados	7	9,4	3,0x10 ⁴	10	10	0	10	0
Alimentos preparados (diversos)	14	1,9	3,0x10 ⁴	21	21	0	21	0
Salgadinhos e sanduiches	6	0,94	3,0x10 ⁴	6	6	0	6	0
	158	—	—	236	235	1	233	3

* Massa seca.

** Leite em pó.

*** Contrafilé preparado (bife).

GELLI, D.S. & MARTINS, M.C. — *Staphylococcus aureus* produtor de termonuclease em alimentos. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 46 (1/2): 103-109, 1986.

TABELA 2

Valores de unidade formadora de colônias (u.f.c.) de *S. aureus* e resultados dos testes de desoxirribonuclease e de termonuclease, obtidos na análise de alimentos e cepas envolvidos em casos de intoxicação alimentar

Amostras de alimentos analisadas		Valores de u.f.c. por g (ml) do produto			Cepas de <i>S. aureus</i> testadas			
Tipo	Número	Mínimo	Máximo	Total	Teste de DNase		Teste de TNase	
					Positivas	Negativas	Positivas	Negativas
Bolos e doces de confeitaria	27	4,6x10 ⁵	3,0x10 ⁹	77	77	0	77	0
Queijo	10	2,4x10 ⁶	3,0x10 ⁸	24	24	0	24	0
Carnes prontas e alimentos preparados com carne	6	6,0x10 ⁵	3,0x10 ⁸	23	23	0	23	0
Alimentos preparados com cereais e derivados	3	1,7x10 ⁷	2,4x10 ⁷	16	16	0	16	0
Salgadinho	1	1,1x10 ⁵ *	—	1	1	0	1	0
* Valor único	47	—	—	146	146	0	146	0

conforme metodologia descrita^{3, 30}, o teste de DNase foi efetuado conforme descrito por STREITFELD et alii²⁰, o teste de TNase foi realizado pela técnica em lâmina, conforme publicação de LACHICA et alii^{16, 17, 18}, usando porém fórmula compensada para o preparo do ágar DNA, como segue: em um frasco Erlenmeyer, com 100 ml de água destilada, colocar 0,61 g de hidroximetil amino metano (TRIS) e dissolver. Ajustar o pH para 9. Adicionar 0,147 g de cloreto de cálcio anidro, 0,875 g de cloreto de sódio, 0,63 g de ágar e 1,05 g de ágar DNA, aquecer até a ebulição e adicionar 0,92 ml de solução aquosa de azul de toluidina a 1%. Distribuir 3 ml em cada lâmina. Esta fórmula mantém a concentração adequada dos componentes, apesar do uso de ágar DNA ao invés de DNA puro, que é mais oneroso e de difícil obtenção.

DISCUSSÃO

Na tabela 1, observa-se a presença de cepa não-produtora de DNase e TNase em amostras de macarrão seco, sem recheio, que sofreram tratamento térmico para a secagem, e cepas produtoras de DNase mas não de TNase provenientes de leite em pó (produto seco) e de carne preparada, no caso bife frito, na qual não foi possível determinar o seu preparo, não sendo portanto 100% concordantes os resultados referentes à produção de DNase e TNase. Estas cepas foram isoladas de alimentos não-envolvidos em intoxicações e sugerem que a relação DNase-TNase deve ser avaliada.

A tabela 2 exhibe resultados 100% positivos quanto à produção de TNase e de DNase pelas cepas isoladas de alimentos envolvidos em intoxicações.

Os testes de isolamento das cepas, a partir dos alimentos, foram feitos utilizando-se meios de enriquecimento seletivo e/ou seletivos diferenciais, respectivamente, caldo trip-tona de soja com 10% de cloreto de sódio e ágar Baird Parker ou Vogel-Johnson³⁰. Estes meios e seus agentes seletivos podem influenciar na recuperação de células bacterianas que apresentam injúrias fisiológicas por retirada de água (secagem) ou abaixamento de pH (acidulação), ou por outros métodos utilizados nos processos de transformação de alimentos. Apesar de os meios de cultura utilizados serem os recomendados para o isolamento do *S. aureus*, os mesmos, por sua natureza seletiva, podem ter interferido na recuperação de células de *S. aureus* dos produtos considerados inadequados para manter a sua viabilidade. Esta seria uma explicação para os achados da tabela 1, uma vez que as amostras de alimentos constantes da tabela 2 são de produtos favoráveis para

manutenção da viabilidade e/ou desenvolvimento desta bactéria. Deve ser considerado, neste contexto, que as cepas estavam mantidas em meios de culturas adequados, em estado de cultura pura e típica, conforme evidênciação microscópica e análise das características morfotintoriais pela coloração de Gram.

CONCLUSÃO

Está estabelecido que o teste de coagulase é definitivo na comprovação laboratorial do *S. aureus*. Atualmente, inclui-se a termonuclease para confirmação desta bactéria. TATINI et alii^{29, 31}, consideram a TNase como forte indicadora da presença de enterotoxina estafilocócica em alimentos.

No presente trabalho, observaram-se cepas produtoras de DNase e TNase responsáveis pela produção de enterotoxina estafilocócica em alimentos envolvidos em enfermidades transmitidas por alimentos. Em alimentos não-envolvidos nestes eventos, não se detectou capacidade de produção de TNase em três cepas e de DNase em uma cepa. Se analisadas as características do produto alimentício, verifica-se que a incidência de *S. aureus* DNase e TNase positivas ocorrem em produtos com atividade de água, concentração de cloreto de sódio e acidez normais.

Pelos dados obtidos no presente estudo, sugerimos que sejam realizados experimentos que permitam avaliar a incidência e/ou seleção de cepas produtoras e não-produtoras de DNase e TNase nos diversos tipos de alimentos, de acordo com o processo tecnológico de obtenção e temperatura de manutenção dos mesmos. Ainda, devem ser realizados mais levantamentos para estabelecer a correlação da presença da enterotoxina estafilocócica e da TNase, especialmente quando da ausência de células viáveis de *S. aureus* nos alimentos envolvidos em intoxicações, na tentativa de se estabelecer este critério laboratorial, de forma inequívoca, quando da elucidação destes surtos de doenças causadas por alimentos⁶.

Agradecimentos

Agradecemos às Sras. Harumi Sakuma, Marília A.A. Rossini, Miyoko Jakabi, Alice Yoshico Tanaka, Regina Cesper, Aracelis M. Freitas, Marilu M.M. Rocha, Beatriz Pisani, Marilice P. Vicente, Maria T.F. de Castro, Mítuca Kaku, Eliana G.A. Ribeiro e Marina A.S.R. Pacheco, do Instituto Adolfo Lutz, pela colaboração prestada na realização do presente trabalho. Aos Srs. Adilson Manoel Godoy e Dr. Sebastião Timo Iaria, do Instituto de Ciências Biológicas da USP, pelo fornecimento da fórmula compensada e demonstração técnica.

RIALA6/617

GELLI, D.S. & MARTINS, M.C. — Thermonuclease production by *Staphylococcus aureus* from foods. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 46(1/2):103-109, 1986.

SUMMARY: An analysis was made of 205 samples of foods, and of 382 strains of *Staphylococcus aureus*. The analysis included two classes of foods: a) 158 samples not involved in food-borne intoxications with 256 strains; b) 47 samples of foods involved in food-borne diseases. A strain was isolated which did not produce DNase or TNase from macaroni while powder milk and fried beef steak yielded strains which produced DNase but not TNase. So, the results of DNase and TNase were not in agreement. All strains isolated from class b samples produced both DNase and TNase.

DESCRIPTORS: *Staphylococcus aureus* in food, thermonuclease.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BAIRD-PARKER, A.C. — Gram-positive cocci. In: *Bergey's Manual of determinative bacteriology*, edited by R.E. BUCHANAN & GIBBONS. 8th ed. Baltimore, Md., Williams & Wilkins, 1974. p. 484-9.
2. BARRY, A.L.; LACHICA, R.V. & ATCHISON, F.W. — Identification of *Staphylococcus aureus* by simultaneous use of tube coagulase and thermonuclease tests. *Appl. Microbiol.*, 25:496-7, 1973.
3. BENNETT, R.W. — *Staphylococcus aureus*. In: ESTADOS UNIDOS. Food and Drug Administration — *Bacteriological analytical manual*, 6th ed. Washington, A.O.A.C., 1984. p. 14.01-14.04.
4. BERGDOLL, M.S. — Staphylococcal intoxications. In: RIEMANN, H. & BRYAN, F.L. — *Foodborne infections and intoxications*. 2nd ed. New York, Academic Press, 1979. p. 443-94.
5. BERGDOLL, M.S. & BENNETT, R.W. — Staphylococcal enterotoxins. In: SPECK, M.L., ed. — *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. 2nd ed. Washington, D.C., APHA, 1984. p. 428-57.
6. BISSONETTE, N.; LACHANCHE, R.A.; GOULET, J.; LANDGRAF, M.; & PARK, C.E. — Evidence of thermonuclease production by *Bacillus* sp. and enterococci in naturally contaminated cheese. *Can. J. Microbiol.*, 26:722-5, 1980.
7. BLAIR, E.B.; EMERSON, J.S. & TULL, A.H. — A new medium, salt mannitol plasma agar, for the isolation of *Staphylococcus aureus*. *Am. J. Clin. Pathol.*, 47: 30-9, 1967.
8. CASMAN, E.P. — Staphylococcal food poisoning. *Health Lab. Sci*; 4:199-206, 1967.
9. CHAPMAN, G.H., BEREN, C.; PETERS, A. & CURCIO, L. — Coagulase and hemolysin tests as measures of the pathogenicity of staphylococci. *J. Bacteriol.*, 28: 343-63, 1934.
10. CHRISTIE, A.B. & CHRISTIE, M.C. — *Food hygiene and food hazards*. 2nd ed. London, Faber and Faber, 1977. p. 32-7; 54-5; 260-3.
11. CORDS, B.R. & TATINI, S.R. — Applicability of heat-stable deoxyribonuclease assay for assessment of staphylococcal growth and the likely presence of enterotoxin in cheese. *J. Dairy Sci.*, 56:1512-9, 1973.
12. EIROA, M.N.U. — O controle de qualidade dos alimentos. *Bol. Inst. Tecnol. Aliment.*, 49:1-32, 1977.
13. **FOODBORNE disease outbreaks**. Annual summary, 1982. *MMWR CDC Surveill Summ.*, 35(1SS): 11SS, 1986.
14. HACKLER, J.F. — Outbreak of staphylococcus milk poisoning in pasteurized milk. *Am. J. Pub. Health*, 29:1247-9, 1939.
15. HOBBS, B.C. — *Food poisoning and food hygiene*. 3rd ed. London, Edward Arnold, 1974. p. 22-4; 32-4; 53-4; 106-7.
16. LACHICA, R.V.F.; GENIGEORGIS, C. & HOEPRICH, P.D. Metachromatic agar-diffusion methods for detecting staphylococcal nuclease activity. *Appl. Microbiol.*, 21:585-7, 1971.
17. LACHICA, R.V.F.; HOEPRICH, P.D. & GENIGEORGIS, C. — Metachromatic agar-diffusion microslide technique for detecting staphylococcal nuclease in foods. *Appl. Microbiol.* 23:168-9, 1972.
18. LACHICA, R.V.F.; HOEPRICH, P.D. & GENIGEORGIS, C. — Nuclease production and lysostaphin susceptibility of *Staphylococcus aureus* and other catalase-positive cocci. *Appl. Microbiol.*, 21: 823-6, 1971.

19. LEE, W.H.; STAPLES, C.L. & OLSON, J.C., JR. — *Staphylococcus aureus* growth and survival in macaroni dough and the persistence of enterotoxins in the dried products. *J. Food Sci.*, 40:119-20, 1975.
20. LEITÃO, M.F.F. — Métodos para a caracterização de *Staphylococcus aureus* enteropatógeno. *Bol. Inst. Tecnol. Aliment.*, 36:21-46, 1973.
21. MENZIES, R.E. — Comparison of coagulase, deoxyribonuclease (DNase) and heat-stable nuclease for identification of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Pathol.*, 30:606-8, 1977.
22. MINOR, T.E. & MARTH, E.H. — *Staphylococci and their significance in foods*. Amsterdam, Elsevier, 1976. p. 297.
23. ORGANIZAÇÃO PAN AMERICANA DE SAÚDE — *Controle das doenças transmissíveis no homem*. 13.^a ed. Washington, D.C., OPAS, 1973. p. 208-13 (Publ. Científica 442).
24. PARK, C.E.; DERE, H.B. & RAYMAN, M.K. — Evaluation of staphylococcal thermonuclease (TNase) assay as a mean of screening foods for growth of *Staphylococci* and possible enterotoxin production. *Can. J. Microbiol.* 24:1335-9, 1978.
25. PARK, C.E.; SERRANO, A.M.; LANDGRAF, M.; HUANG, J.C.; STANKIEWICZ, Z. & RAYMAN, M.K. — A survey of microorganisms for thermonuclease production. *Can. J. Microbiol.*, 26:532-3, 1980.
26. STREITFELD, M.M., HOFFMANN, E.M. & JANKLOW, H.M. — Evaluation of extracellular deoxyribonuclease activity in pseudomonas. *J. Bacteriol.*, 84:77-80, 1962.
27. SLOCUM, G.G. & LINDEN, B.A. — Food poisoning due to *Staphylococci*. *Am. J. Publ. Health*, 29:1326-30, 1939.
28. SPERBER, W.H. & TATINI, S.R. — Interpretation of the tube coagulase test for identification of *Staphylococcus aureus*. *Appl. Microbiol.*, 29:502-5, 1975.
29. TATINI, S.R.; CORDS, B.R. & GRAMOLI, J. — Screening for staphylococcal enterotoxins in food. *Food Technol.*, 30:64-74, 1976.
30. TATINI, S.R.; HOOVER, D.G. & LACHICA, R.V.F. — Methods for the isolation and enumeration of *Staphylococcus aureus*. In: SPECK, M.L. ed. — *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. 2nded. Washington, D.C., APHA, 1984. p. 411-27.
31. TATINI, S.R.; SOO, H.M.; CORDS, B.R. & BENNETT, R.W. — Heatstable nuclease for assessment of staphylococcal growth and likely presence of enterotoxins in foods. *J. Food Sci.*, 40:352-6, 1975.

Recebido para publicação em 29 de outubro de 1986.

