

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Veterinária



Dissertação

Caracterização fenotípica de *Staphylococcus aureus* isolados de alimentos de origem animal e de outras fontes relacionadas

Julia Rosin da Silva

Pelotas, 2019

Julia Rosin da Silva

Caracterização fenotípica de *Staphylococcus aureus* isolados de alimentos de origem animal e de outras fontes relacionadas

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área de concentração: Sanidade Animal).

Orientador: Cláudio Dias Timm

Pelotas, 2019

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

S586c Silva, Julia Rosin da

Caracterização fenotípica de *Staphylococcus aureus* isolados de alimentos de origem animal e de outras fontes relacionadas / Julia Rosin da Silva ; Cláudio Dias Timm, orientador. — Pelotas, 2019.

39 f.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 2019.

1. Biofilme. 2. Estresse subletal. 3. Contaminação experimental. 4. Meticilina. I. Timm, Cláudio Dias, orient. II. Título.

CDD : 636.089

Julia Rosin da Silva

Caracterização fenotípica de *Staphylococcus aureus* isolados de alimentos de origem animal e de outras fontes relacionadas

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências, Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 12/02/2019

Banca examinadora:

Prof. Dr. Cláudio Dias Timm (Orientador)
Doutor em Ciência e Tecnologia Industrial pela Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Eliezer Avila Gandra
Doutor em Ciência e Tecnologia Industrial pela Universidade Federal de Pelotas

Dra. Silvia Regina Leal Ladeira
Doutora em Ciências Veterinárias pela Universidad Nacional de La Plata

Profa. Dra. Natacha Deboni Cerese
Doutora em Medicina Veterinária pela Universidade Estadual Paulista

Resumo

SILVA, Julia Rosin da. **Caracterização fenotípica de *Staphylococcus aureus* isolados de alimentos de origem animal e de outras fontes relacionadas.** 2019. 39f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2019.

As bactérias agrupadas em biofilmes geralmente são mais resistentes a diferentes condições ambientais. A permanência e o comportamento de um micro-organismo em um alimento são determinados por fatores intrínsecos e extrínsecos relacionados ao alimento, os quais podem influenciar também a formação de biofilme. Além disso, isolados de *S. aureus* podem apresentar resistência a antibióticos, dentre eles a meticilina. O objetivo do presente estudo foi caracterizar fenotipicamente isolados de *S. aureus* provenientes de leite cru bovino e de diferentes pontos do fluxograma de abate de suínos, de modo a avaliar a capacidade de formação de biofilme e fatores que podem influenciar essa capacidade, comportamento da bactéria no ambiente propiciado pelos alimentos e sua sensibilidade antimicrobiana à meticilina. Foram utilizados 28 isolados de *S. aureus*, sendo sete provenientes de leite cru bovino e 21 relacionados a suínos. Os isolados foram avaliados quanto à capacidade de produção de biofilme em placas de microtitulação. Também foi verificada a capacidade de produção de biofilme por alguns isolados não formadores e fortes formadores de biofilme após serem submetidos a diferentes tipos de estresse subletal (42°C, 4°C, pH 5,0 e 5% de NaCl). O comportamento de *S. aureus* em alimentos foi testado através da contaminação experimental em lombo suíno e leite integral UHT. Ainda, foi avaliada a sensibilidade dos isolados à meticilina pelo teste de disco-difusão. Dos isolados testados, 57,1% (16/28) foram capazes de formar biofilme, sendo 85,7% (6/7) oriundos de leite e 47,6% (10/21) de suínos. Dos três isolados previamente classificados como fortes formadores de biofilme, a maioria manteve essa capacidade após submetidos aos diferentes tipos de estresse subletal. Já em relação aos três isolados não formadores de biofilme testados, apenas um manteve-se inalterado e os outros tornaram-se fracos formadores na maioria dos estresses, exceto um dos isolados, o qual passou a ser moderado formador de biofilme quando exposto ao estresse pelo calor e salinidade. A verificação da capacidade de sobrevivência e multiplicação de *S. aureus* em alimentos, demonstrou que tanto os isolados provenientes de leite cru bovino quanto os de carcaças de suínos foram capazes de sobreviver durante cinco dias em leite UHT e carne suína sob refrigeração, porém, não se multiplicaram. Em relação a sensibilidade à meticilina, 42,9% (12/28) dos isolados foram classificados como resistentes e, desses, 85,7% (6/7) eram isolados de leite e 28,6% (6/21) de suínos. Os resultados obtidos ampliam o conhecimento a respeito das características de *S. aureus*, assim, torna-se possível a adoção dos procedimentos apropriados para evitar a multiplicação de *S. aureus* em alimentos.

Palavras-chave: biofilme; estresse subletal; contaminação experimental; meticilina

Abstract

SILVA, Julia Rosin da. **Phenotypic characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from food of animal origin and other related sources**. 2019. 39f. Dissertation (Master degree in Sciences) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2019.

Bacteria grouped in biofilms are generally more resistant to different environmental conditions. The permanence and behavior of a microorganism in a food are determined by intrinsic and extrinsic factors related to food, which can also influence biofilm formation. In addition, *S. aureus* isolates may be resistant to antibiotics, including methicillin. The objective of the present study was to characterize phenotypically isolates of *S. aureus* from bovine raw milk and from different points of the swine slaughterhouse flowchart in order to evaluate the capacity of biofilm formation and factors that may influence this ability, bacterial behavior in the food environment and its antimicrobial susceptibility to methicillin. Twenty-eight *S. aureus* isolates were used, seven of which were derived from bovine raw milk and 21 from swine. The isolates were evaluated for biofilm production capacity in microtiter plates. The biofilm production capacity was also verified by some non-forming isolates and strong biofilm builders after subjecting them to different types of sublethal stress (42°C, 4°C, pH 5,0 and 5% NaCl). The behavior of *S. aureus* in food was tested through experimental contamination in pork loin and UHT whole milk. Furthermore, the sensitivity of the isolates to methicillin was assessed by the disc-diffusion test. Of the isolates tested, 57,1% (16/28) were able to form biofilm, 85,7% (6/7) from milk and 47,6% (10/21) from pigs. Of the three isolates previously classified as strong biofilm builders, most maintained this ability after being submitted to different types of sublethal stress. Concerning the three non-biofilm-forming isolates tested, only one remained unchanged and the others became weak formers in most of the stresses, except one of the isolates, which became a moderate biofilm-forming agent when exposed to stress by heat and salinity. The verification of the survival and multiplication capacity of *S. aureus* in food showed that both isolates from bovine and porcine raw milk were able to survive for five days in UHT milk and pork under refrigeration. have multiplied. Regarding the sensitivity to methicillin, 42,9% (12/28) of the isolates were classified as resistant, and of these, 85,7% (6/7) were isolated from milk and 28,6% (6/21) from swine. The results obtained increase the knowledge about the characteristics of *S. aureus*, thus, it is possible to adopt the appropriate procedures to avoid the multiplication of *S. aureus* in foods.

Keywords: biofilm; sublethal stress; experimental contamination; methicillina

Lista de Tabelas

Tabela 1	Origem das cepas de <i>S. aureus</i> utilizadas para a caracterização fenotípica.....	16
Tabela 2	Capacidade de formação de biofilme por isolados de <i>S. aureus</i> após serem submetidos a diferentes tipos de estresse subletal.....	20
Tabela 3	Resultados das contagens de <i>S. aureus</i> (UFC/g ou UFC/mL) nos diferentes dias de análise (médias de três repetições).....	21

Sumário

1 Introdução.....	7
2 Artigo.....	13
3 Considerações Finais.....	29
Referências.....	30

1 Introdução

O leite bovino apresenta na sua composição elevada quantidade de nutrientes essenciais à saúde humana e, além disso, é fonte de renda para os diferentes segmentos da sua cadeia produtiva (RIBEIRO, 2008). No primeiro trimestre do ano de 2018, a aquisição de leite cru por estabelecimentos que atuam sob inspeção sanitária foi de 6 bilhões de litros de leite, o que demonstra o primeiro aumento após três anos de quedas consecutivas entre os primeiros trimestres. O volume do produto foi 2,4% maior que o obtido no mesmo período em 2017. O Rio Grande do Sul ocupa o segundo lugar da aquisição nacional de leite, sendo o primeiro lugar ocupado por Minas Gerais (IBGE, 2018).

Paralelamente à sua importância, o leite bovino constitui um meio propício para o desenvolvimento de micro-organismos indesejáveis, como os patogênicos e os deteriorantes. Esse fato está relacionado a fatores intrínsecos desse alimento, como pH, concentração de sal e atividade da água (TEUBER, 1992; NECIDOVÁ et al., 2009).

O leite bovino não submetido a pasteurização, ou inadequadamente submetido a esse tratamento térmico, pode tornar-se um veículo potencial para a transmissão de diferentes patógenos veiculados por alimentos, dentre eles, *Staphylococcus aureus* (KADARIYA et al., 2014). Esse micro-organismo pode contaminar o leite a partir de glândulas mamárias de vacas com mastite estafilocócica clínica ou subclínica, por contaminação durante o manuseio do leite cru, bem como pelo mau armazenamento do produto na propriedade rural (LEJEUNE e RAJALA-SCHULTZ, 2009).

A proteína animal mais produzida e consumida no mundo é a carne suína, seguida da carne de frango e carne bovina. O consumo anual total de carne suína pelos diversos países do mundo é de aproximadamente 110,1 milhões de toneladas. O Brasil é o quinto maior consumidor de carne suína, bem como o quarto maior produtor e exportador dessa carne e, de acordo com dados divulgados em outubro de 2017, houve um crescimento da produção mundial em torno de 1% se comparado a 2016 (USDA, 2017).

A carne suína é constituída em média de 75% de água, 22,8% de proteína, 1,2% de gordura e 1,0% de minerais, além de ser uma excelente fonte de vitaminas hidrossolúveis do grupo B, como tiamina (B1), riboflavina (B2), niacina (B3), piridoxina (B6) e cobalamina (B12), bem como zinco, potássio, ferro e magnésio (ROÇA, 2008). No entanto, devido ao seu alto teor de umidade e nutrientes, a carne suína e seus derivados são importantes veículos de transmissão de bactérias patogênicas, podendo causar Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) (PARDI et al., 2006).

As DTA são causadas pela ingestão de alimentos contaminados, principalmente por micro-organismos patogênicos ou suas toxinas e constituem um grave problema de saúde pública. Essas doenças resultam em sintomas que cursam com náusea, vômito, dores abdominais, diarreia, e, em casos mais graves, septicemias e morte, principalmente em pacientes imunossuprimidos (BRASIL, 2001). Segundo dados do Sistema Único de Saúde do Ministério da Saúde, de 2000 a 2017 ocorreram 239.164 casos de doentes acometidos por DTA no Brasil (SUS, 2018), dentre elas, intoxicações causadas por *S. aureus*.

Staphylococcus spp. são micro-organismos que podem estar presentes na água, solo, trato respiratório, pele e transitoriamente no trato gastrointestinal do homem e de outros animais, incluindo os suínos (JAY, 2000). A espécie *Staphylococcus aureus* está comumente presente na pele e fossas nasais de humanos saudáveis, os quais estão entre seus principais reservatórios (BANNERMAN et al., 2003). Na indústria de alimentos, os manipuladores portadores de *S. aureus* podem se tornar importantes fontes de contaminação para os produtos (LANCETTE et al., 1992; ASPERGER, 1994; FRANCO e LANGRAF, 2005; GUTIÉRREZ et al., 2012).

No fluxograma de abate de suínos, a contaminação por micro-organismos patogênicos, como *S. aureus*, pode ocorrer através do próprio animal (KHANNA et al., 2008), ou ainda, pode estar associada à contaminação cruzada pela manipulação das carcaças suínas por humanos portadores assintomáticos da bactéria (PODPECAN et al., 2007).

As bactérias do gênero *Staphylococcus* pertencem à família *Staphylococcaceae*, são cocos Gram-positivos com diâmetro entre 0,5 a 1,5 µm, que podem estar dispostos aos pares, em cadeias curtas ou agrupados de forma semelhante a cachos de uva e são, na sua maioria, anaeróbios facultativos (QUINN, 2005; SCHLEIFER e BELL, 2010; GERMANO e GERMANO, 2015). Esses microorganismos são capazes de se multiplicar em temperaturas entre 7 e 48°C, com crescimento ótimo entre 30 e 37°C, e de produzir enterotoxinas termorresistentes entre 10 e 48°C, com temperatura ótima para produção entre 40 e 45°C (FRANCO e LANGRAF, 2005).

O gênero *Staphylococcus* compreende 52 espécies e 28 subespécies (LPSN, 2017), as quais podem ser caracterizadas como coagulase negativa ou positiva, de acordo com a capacidade de produzir a enzima coagulase e converter o fibrinogênio em fibrina, evitando a ação fagocitária no local de infecção (QUINN, 2011; HENNEKINNE et al., 2012). Dentre as espécies coagulase positiva, *S. aureus* é a mais frequentemente associada a surtos de intoxicação alimentar, devido a capacidade de várias cepas produzirem enterotoxinas (OMOE et al., 2005; GERMANO e GERMANO, 2015), seguida de *S. intermedius* e *S. hyicus*, também produtores de enterotoxinas, mas em menor proporção (BECKER et al., 2001).

A ingestão de enterotoxinas estafilocócicas pré-formadas nos alimentos por cepas enterotoxigênicas de *S. aureus* resulta em intoxicação alimentar (FRANCO e LANGRAF, 2005). Essas enterotoxinas são proteínas de baixo peso molecular, hidrossolúveis e resistentes às ações proteolíticas de enzimas presentes no sistema digestivo, permanecendo ativas após a ingestão (FRANCO e LANGRAF, 2005). São produzidas e liberadas no alimento durante a multiplicação de *Staphylococcus* spp., e são termorresistentes devido à presença de proteínas compactadas e não hidratadas em sua estrutura molecular, portanto, uma vez formadas, não são eliminadas durante o processamento térmico dos alimentos (CARMO et al., 2002). A quantidade de 100 ng a 1 µg de toxina, quando ingerida, já é suficiente para causar a doença em indivíduos saudáveis (BERGDOLL, 1990).

A intoxicação causada por *S. aureus* no ser humano é caracterizada pela presença de sinais clínicos que cursam com náuseas, vômito e dores abdominais, com ou sem diarreia, e pelo início súbito, que ocorre normalmente de duas a oito horas após a ingestão do alimento contaminado. A doença é geralmente autolimitante, com resolução dos sinais clínicos em 24 a 48 horas após o início dos

sintomas. Porém, essa enfermidade pode tornar-se grave quando acomete crianças, idosos e imunossuprimidos, sendo necessária hospitalização em alguns casos (TRANTER, 1990; BALABAN, 2000; MURRAY, 2005).

De acordo com dados do Sistema Único de Saúde do Ministério da Saúde, *S. aureus* é o 3º agente etiológico mais envolvido em surtos alimentares no Brasil (SUS, 2018). A maioria dos surtos possivelmente se deve ao manejo inadequado de alimentos na indústria ou nos domicílios (WU et al., 2016).

S. aureus pode apresentar capacidade de formar biofilme em diferentes superfícies, tanto em superfícies orgânicas, como mucosas de vários tecidos, quanto inorgânicas (HONARY et al., 2014), como em superfícies de equipamentos utilizados nas indústrias de alimentos (SANTOS, 2009; LEE et al., 2014; COSTA et al., 2016). O biofilme bacteriano é uma comunidade de micro-organismos sésseis embebidos em uma matriz extracelular formada por exopolissacarídeos, que se aderem a uma determinada superfície formando uma camada espessa, na qual os micro-organismos continuam a se multiplicar (PARIZZI, 1998; DONLAN e COSTERTON, 2002). Na indústria de alimentos, como no processamento de carnes e produtos lácteos, a formação de biofilme é preocupante, tendo em vista que a lavagem e a sanitização podem não garantir a eliminação completa dos micro-organismos (VIANA, 2006). Uma vez formados, os biofilmes atuam como fontes de contaminação constante, liberando células das bactérias que o estão constituindo, podendo comprometer a qualidade microbiológica dos alimentos (FUSTER-VALLS et al., 2008).

A estrutura do biofilme confere a permanência bacteriana sobre as diferentes superfícies, auxiliando a manutenção das células unidas. Com isso, há possibilidade de ocorrer comunicação entre elas, a qual é denominada *quorum sensing* (SHI et al., 2014). No mecanismo de *quorum sensing* ocorre a produção e liberação de moléculas de sinalização para o meio, o que resulta na expressão de diversos genes bacterianos (ROMERO et al., 2012). Essa comunicação desempenha um importante papel na adesão celular, conferindo uma maior proteção ao biofilme (ANTUNES, 2003). As células bacterianas no biofilme são envoltas por uma matriz extracelular autoproduzida, composta basicamente de material polissacarídico, o qual representa mais de 90% da massa do biofilme (BEZERRA et al., 2009).

Os micro-organismos agrupados em biofilmes geralmente sofrem menos a ação de estresses ambientais (COSTERTON et al., 1987). Portanto, quando

submetidos a estresse térmico, alterações de pH, choques osmóticos, radiações ultra-violeta, força mecânica ou a processos de sanitização, podem manter-se viáveis em determinada superfície, tendo em vista que o biofilme pode oferecer proteção contra esses fatores (CHAVANT et al., 2007).

Condições intrínsecas do alimento como pH, salinidade, atividade de água, bem como fatores ambientais, dentre eles umidade e temperatura de estocagem, podem influenciar na permanência e comportamento do micro-organismo no alimento. Além disso, essas condições podem resultar na formação de biofilme, devido a exposição da bactéria a fatores de estresse (JEFFERSON, 2004). Em relação a indústria de alimentos, mostra-se essencial identificar condições sob as quais *S. aureus* é capaz de sobreviver, se multiplicar e formar biofilme. Portanto, é de extrema importância o conhecimento a respeito da capacidade microbiana de formar biofilme, bem como da influência de condições intrínsecas e extrínsecas nessa capacidade e no comportamento do micro-organismo no alimento.

A resistência bacteriana a antimicrobianos constitui um sério problema clínico e de saúde pública. O tratamento indiscriminado de animais domésticos com antibióticos pode induzir resistência dos microrganismos aos antibióticos (GUTIERREZ et al., 1990). Isso contribui para a contaminação do ambiente, da cadeia alimentar e para o surgimento de cepas resistentes a drogas de importância para a saúde humana (RAIA, 2001; ROLLIN, 2001; TETZNER et al., 2005). Uma vez que a transmissão de linhagens resistentes através do consumo de alimentos de origem animal possa ocorrer, evidencia-se um grave risco para a saúde dos consumidores (GUIMARÃES, 2011).

S. aureus, um dos micro-organismos mais frequentemente isolados de mastite bovina, pode apresentar resistência a diversos antibióticos utilizados rotineiramente no tratamento dessa doença (BRITO et al., 2001; FREITAS et al., 2005; MEDEIROS et al., 2009; ZANETE et al., 2010; ALEKISH et al., 2013; WANG et al., 2014; COSTA et al., 2016; ARGUDÍN et al., 2017). Entre os antimicrobianos aos quais *S. aureus* mostra-se resistente, a meticilina é um dos mais preocupantes em termos de saúde pública, tendo em vista que cepas de *S. aureus* resistentes à meticilina são comumente identificadas como causadoras de infecções hospitalares (INTRAKAMHA et al., 2012; RABELO et al., 2014). Desta forma, é importante a verificação da sensibilidade à meticilina de isolados oriundos de produtos de origem

animal, a fim de contribuir para um melhor controle da transmissão de cepas resistentes.

O objetivo do presente estudo foi caracterizar fenotipicamente isolados de *S. aureus* provenientes de leite cru bovino e de diferentes pontos do fluxograma de abate de suínos, de modo a avaliar as características de cada isolado, incluindo a capacidade de formação de biofilme e fatores que podem influenciar essa capacidade, o comportamento da bactéria no ambiente propiciado pelos alimentos e a sensibilidade à meticilina.

2 Artigo

Caracterização fenotípica de *Staphylococcus aureus* isolados de alimentos de origem animal e de outras fontes relacionadas

Julia Rosin da Silva, Greyce Silveira Mello, Thamíris Pereira de Moraes, Lauren Machado Moreira, Thaís Gonçalves Gonçalves, Cláudio Dias Timm

Submetido à revista Brazilian Archives of Biology and Technology

Caracterização Fenotípica de *Staphylococcus aureus* Isolados de Alimentos de Origem Animal e de Outras Fontes Relacionadas

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi caracterizar fenotipicamente isolados de S. aureus provenientes de leite cru bovino e de diferentes pontos do fluxograma de abate de suínos, de modo a avaliar a capacidade de formação de biofilme e fatores que podem influenciar essa capacidade, o comportamento da bactéria no ambiente alimentar e sua sensibilidade à meticilina. Foram utilizados 28 isolados de S. aureus, sendo sete provenientes de leite cru bovino e 21 relacionados a suínos. A capacidade de produção de biofilme foi verificada em 57,1% (16/28) dos isolados testados, sendo 85,7% (6/7) oriundos de leite e 47,6% (10/21) de suínos. Já em relação a capacidade de produção de biofilme após a exposição a diferentes tipos de estresse subletal, dos três isolados previamente classificados como fortes formadores de biofilme, a maioria manteve essa capacidade. E dos três isolados não formadores de biofilme testados, apenas um manteve-se inalterado, enquanto os outros tornaram-se fracos formadores na maioria dos estresses, exceto um dos isolados, o qual passou a ser moderado formador de biofilme quando exposto ao estresse pelo calor e salinidade. A verificação da capacidade de sobrevivência e multiplicação de S. aureus demonstrou que tanto os isolados de leite cru bovino quanto os de carcaças de suínos foram capazes de sobreviver durante cinco dias em leite UHT e carne suína sob refrigeração, porém, não houve multiplicação. Já em relação a sensibilidade dos isolados à meticilina, 42,9% (12/28) foram resistentes e, desses, 85,7% (6/7) eram isolados de leite e 28,6% (6/21) de suínos.

Palavras-chave: biofilme; estresse subletal; contaminação experimental; meticilina

INTRODUÇÃO

O gênero *Staphylococcus* spp. contém espécies que são patógenos oportunistas de humanos e animais domésticos, sendo comum sua presença na pele e fossas nasais ¹. Esses micro-organismos estão envolvidos em diversos casos de intoxicações alimentares, tendo em vista que algumas cepas são produtoras de enterotoxinas ^{2,3}. Essas enterotoxinas são termorresistentes, portanto, uma vez pré-formadas não são eliminadas durante o processamento térmico dos alimentos ⁴, como a pasteurização do leite. As enterotoxinas estafilocócicas são detectáveis nos alimentos em contagens de *S. aureus* acima de 10⁵ UFC/mL ou g de alimento ^{5,6,7,8}.

Staphylococcus são bactérias caracterizadas como coagulase positiva ou negativa, de acordo com a capacidade de produzir a enzima coagulase e converter o fibrinogênio em fibrina ^{9,10}. As principais espécies de *Staphylococcus* coagulase positiva são *S. aureus*, *S. hyicus* e *S. intermedius*, sendo *S. aureus* a mais frequentemente relacionada a surtos de intoxicação alimentar ^{11,12,13}.

S. aureus apresenta capacidade de formar biofilme em diferentes tipos de materiais comumente utilizados nas indústrias de alimentos ^{14,15,16,17}, o que evidencia o potencial de persistência do patógeno em

superfícies de equipamentos e utensílios que entram em contato com o produto alimentício. Biofilmes são complexos ecossistemas de micro-organismos sésseis que, ao se aderirem a superfícies, formam uma camada espessa, na qual os micro-organismos continuam a se multiplicar^{18, 19}. Uma vez formados, os biofilmes liberam células das bactérias que o estão constituindo e atuam como fontes de contaminação constante, podendo comprometer a qualidade microbiológica dos alimentos²⁰.

Condições intrínsecas relacionadas aos alimentos como pH, salinidade, atividade de água, bem como fatores ambientais, dentre eles umidade e temperatura, podem influenciar a permanência e comportamento do micro-organismo no alimento. Além da influência na adaptação do micro-organismo ao alimento, essas condições podem propiciar a formação de biofilme, devido a exposição da bactéria a fatores de estresse²¹. Os micro-organismos agrupados em biofilmes são geralmente mais resistentes ao estresse ambiental²². Devido a isso, quando submetidos a estresse térmico, alterações de pH, choques osmóticos, radiações ultra-violeta, força mecânica ou a processos de sanitização, podem manter-se viáveis em determinada superfície, tendo em vista que o biofilme pode oferecer proteção contra esses fatores²³. Portanto, mostra-se importante identificar condições sob as quais *S. aureus* é capaz de sobreviver, se multiplicar e formar biofilme.

S. aureus, micro-organismo frequentemente causador de mastite bovina, pode apresentar resistência a diversos antibióticos, dentre eles, a meticilina é um dos mais preocupantes, tendo em vista que cepas de *S. aureus* resistentes à meticilina são comumente relacionadas à infecções hospitalares^{24, 25}. Para a identificação de *S. aureus* resistentes à meticilina, o método mais utilizado é o teste de disco difusão, podendo ser utilizados os antibióticos oxacilina e cefoxitina, análogos à meticilina, uma vez que esta não é mais fabricada^{26, 27}.

O objetivo do presente estudo foi caracterizar fenotipicamente isolados de *S. aureus* provenientes de leite cru bovino e de diferentes pontos do fluxograma de abate de suínos, de modo a avaliar as características de cada isolado, como capacidade de formação de biofilme e fatores que podem influenciar essa capacidade, bem como o comportamento da bactéria no ambiente propiciado pelos alimentos e sua sensibilidade à meticilina.

MATERIAL E MÉTODOS

Origem dos isolados

Foram utilizadas 28 cepas de *S. aureus* previamente isoladas de leite cru bovino por Moraes et al.²⁸ e de diferentes pontos do fluxograma de abate de suínos por Moreira et al.²⁹ (Tabela 1).

Tabela 1 - Origem das cepas de *S. aureus* utilizadas para a caracterização fenotípica.

Origem	Fonte	Nº isolados
Bovino	Leite cru	7
Suíno	Fezes das pocilgas de espera	3
	Material retal	4
	após a insensibilização	
	Superfície da pele após a escaldagem	3
	Superfície interna da carcaça	1
	após a evisceração	
	Língua	2
	Linfonodo	3
	Papada	2
	Superfície externa da carcaça	3
	no pré-resfriamento	

Formação de biofilme em placas

Os isolados foram avaliados quanto à sua capacidade de produção de biofilme em placas de microtitulação (Nunclon, Nune, Roskilde, Dinamarca), seguindo a técnica descrita por Janssens et al. ³⁰, com modificações, de forma a adaptar o método para *S. aureus*. Foram colocados 200 µL de Caldo Triptona de Soja (TSB, Acumedia, EUA) em cada poço da placa de microtitulação, adicionados de 2 µL de culturas *overnight* em TSB de cada isolado padronizado em espectrofotômetro a 600 nm para 0,5 de densidade ótica (DO). Poços com 200 µL de TSB, sem cultura bacteriana, foram utilizados como controle. Então, a tampa, contendo vilosidades, foi colocada sobre a placa e incubada durante 48 h a 37°C sem agitação. Durante a incubação, os biofilmes se formaram sobre as vilosidades das tampas. Para quantificação da formação de biofilmes, as tampas foram lavadas em 200 µL de solução salina tamponada com fosfato (PBS, 0,1 M, pH 7,0). O material que permaneceu ligado à tampa foi corado durante 30 min com 200 µL de cristal violeta 0,1% (m/v), lavado em água destilada estéril (200 µL) e a tampa foi secada em temperatura ambiente por 30 min. O biofilme com o corante ligado foi extraído com ácido acético glacial 30% (200 µL) e a DO₅₇₀ de cada poço foi medida. Cada isolado foi classificado como não formador de biofilme, fracamente formador, moderadamente formador ou fortemente formador de biofilme, de acordo com a categorização sugerida por Stepanovic et al. ³¹. O ponto de corte (DOc) foi definido como três desvios padrões acima da média das DOs dos controles e a classificação foi determinada como não formador: $DO \leq DOc$; fraco formador: $DOc < DO \leq 2 \times DOc$; moderado formador: $2 \times DOc < DO \leq 4 \times DOc$; forte formador: $4 \times DOc < DO$.

Formação de biofilme após estresse subletal

Após a classificação quanto à capacidade de formar biofilme, seis isolados de *S. aureus* obtidos de suínos, sendo três considerados não formadores e três fortes formadores, foram utilizados para avaliar o efeito de estresses subletais sobre a formação de biofilme.

Os isolados foram submetidos a diferentes tipos de estresse subletal. Para exposição das células ao choque de calor, culturas *overnight* em TSB foram mantidas em banho-maria a 42°C por 45 min, segundo Chang et al.³². Para exposição ao choque de frio, culturas *overnight* em TSB foram mantidas a 4°C durante 4 h. Os procedimentos descritos por Wong et al.³³ foram utilizados para estressar as células bacterianas em ambiente ácido. Culturas *overnight* em TSB tiveram o pH ajustado para 5,0 com HCl 6N e foram incubadas a 37°C durante 30 min. As células também foram estressadas em ambiente salino. Culturas *overnight* em TSB foram submetidas a concentração de 5% de NaCl. Após a indução ao estresse subletal, os isolados foram testados quanto à capacidade de formação de biofilme em placas de microtitulação (Nunclon, Nune, Roskilde, Denmark), seguindo a técnica já descrita anteriormente³⁰.

Comportamento de *S. aureus* em alimentos refrigerados

Seis isolados de *S. aureus* oriundos de amostras de superfície externa de carcaças de suíno e de leite cru, sendo três de cada uma destas fontes, foram testados quanto à sua capacidade de sobrevivência e multiplicação em alimentos. Foi realizada contaminação experimental em lombo suíno cru e leite integral UHT, respectivamente. Alíquotas de 25 g ou mL desses alimentos foram acondicionadas em embalagens plásticas estéreis e contaminadas com 0,25 mL de cada cultura, de forma a obter-se a concentração final entre 10¹ e 10² células bacterianas/g ou mL de alimento. As amostras foram homogeneizadas, mantidas a uma temperatura de 7°C e analisadas após armazenagem durante 0, 1, 2, 3, 4 e 5 dias. Como controle negativo, foram utilizados 25 g ou mL dos alimentos não inoculados.

Para contagem de *S. aureus* da carne, 25 g foram adicionadas a 225 mL de solução salina 0,85%. Posteriormente, após homogeneização em Stomacher (Logen Scientific), diluições seriadas das amostras foram semeadas em duplicata em ágar Baird-Parker (Himedia, Mumbai, Índia) suplementado com telurito de potássio e emulsão de gema de ovo e foram incubadas a 37°C por 48 h. Após, foram realizadas as contagens das unidades formadoras de colônias, seguida pelo cálculo da média das duplicatas e correção da diluição utilizada para a contagem. Já para recuperação de *S. aureus* do leite, 25 mL foram homogeneizados e, depois de realizada a semeadura da amostra pura, foram adicionadas à amostra 225 mL de solução salina 0,85%. Posteriormente, os procedimentos foram iguais aos realizados para a contagem de *S. aureus* na carne.

Sensibilidade à metilina

Para a avaliação da sensibilidade à metilina, foi realizado o teste de disco-difusão ³⁴ utilizando-se o antimicrobiano Cefoxitina 30 µg (CFO) ³⁵. Após a incubação, os halos inibitórios formados foram medidos com régua graduada e os resultados expressos em milímetros. Foram considerados isolados resistentes aqueles com halos inibitórios menores que 21 mm, e susceptíveis os isolados com halos maiores que 22 mm ³⁵.

Análise estatística

Todos os experimentos foram realizados em triplicata. As médias das contagens de *S. aureus* no decorrer do período de estocagem foram comparadas pelo teste de Tukey.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a verificação da capacidade de formação de biofilme pelos isolados, pôde-se observar que 10,7% (3/28) foram classificados como fortes formadores. O mesmo valor foi obtido para isolados moderados formadores de biofilme. Dos demais isolados, 35,7% (10/28) foram considerados fracos formadores e 42,9% (12/28) não formadores. Portanto, a maioria dos isolados, 57,1% (16/28), foi formadora de biofilme. Dos isolados oriundos de leite, 85,7% (6/7) apresentaram essa capacidade, sendo 66,6% (4/6) fracos, 33,3% (2/6) moderados e nenhum forte formador de biofilme. No que se refere aos isolados provenientes de fontes relacionadas ao fluxograma de abate de suínos, 47,6% (10/21) formaram biofilme, dos quais 60% (6/10) foram classificados como fracos formadores, 10% (1/10) como moderados e 30% (3/10) como fortes formadores.

As origens dos isolados considerados fortes formadores de biofilme foram: pocilgas de espera dos suínos no frigorífico, papada e carcaça na entrada da câmara fria. Esses isolados, por apresentarem maior potencial de formar biofilme, podem permanecer aderidos às superfícies e viáveis por longos períodos, tornando difícil sua eliminação. A forte capacidade de formar biofilme ganha importância em relação ao isolado obtido da carcaça suína na entrada da câmara fria, por ser a última etapa do fluxograma antes do produto ser destinado ao consumidor.

Outros trabalhos também têm identificado a capacidade de *S. aureus* isolados de suínos formarem biofilme. Um estudo realizado na China constatou a capacidade de formar biofilme por *S. aureus* provenientes de um frigorífico de suínos em 100% (62/62) dos isolados testados ³⁶. Em outro estudo realizado no Brasil ³⁷, 93% (27/29) dos isolados de *S. aureus* oriundos de suínos estudados foram produtores de biofilmes.

A capacidade de formar biofilme por *S. aureus* isolados de leite também tem sido demonstrada. Fox et al. ³⁸ verificaram formação de biofilme por 41% (48/117) dos isolados testados. Segundo Lee et al. ¹⁶, 45%

(14/31) dos isolados de *S. aureus* provenientes de leite foram caracterizados como formadores de biofilme. Oliveira et al.³⁹ constataram que 82% (21/26) dos isolados oriundos de mastite bovina, os quais podem estar presentes no leite desses animais, apresentaram capacidade de formar biofilme. Ainda, Melo et al.⁴⁰ verificaram a formação de biofilme por 98,9% (93/94) dos isolados de *S. aureus* provenientes de casos de mastite bovina.

Fatores relacionados a propriedades físico-químicas do material da superfície, à temperatura, ao pH⁴¹ e à expressão de fatores de virulência⁴² influenciam a fixação de macromoléculas e, conseqüentemente, a formação de biofilme.

Operações de higienização executadas inadequadamente contribuem para o acúmulo de bactérias⁴³, favorecendo a formação de biofilme por micro-organismos que apresentam essa capacidade. Em laticínios, a presença de proteínas, gorduras, açúcares e minerais resulta na formação de resíduos que se aderem às superfícies de processamento, o que dificulta a sua eliminação⁴⁴ e favorece a formação de biofilmes. A produção de biofilme bacteriano na indústria de alimentos resulta em graves problemas, tendo em vista que pode facilitar a permanência do micro-organismo em diferentes superfícies de utensílios, equipamentos e instalações que entram em contato com o produto. Além disso, a bactéria estruturada no biofilme pode suportar por mais tempo a privação de nutrientes, bem como desinfetantes, devido a presença de concentrações mais elevadas do micro-organismo^{21,45}. Portanto, a capacidade dos isolados testados de formar biofilme é uma informação importante a ser considerada na elaboração dos procedimentos de higiene a serem adotados na indústria de lácteos e, principalmente, nos frigoríficos de abate de suínos.

Após serem submetidos ao estresse subletal, pôde-se observar que os isolados se comportaram de maneiras distintas. A maioria dos isolados classificados previamente como fortes formadores de biofilme mantiveram essa capacidade (Tabela 2). Já em relação aos isolados considerados não formadores de biofilme, após serem estressados, apenas um manteve-se inalterado. Os outros dois tornaram-se fracos formadores na maioria dos estresses aos quais foram submetidos, exceto um dos isolados, o qual passou a ser moderado formador de biofilme quando exposto aos estresses pelo calor e pela salinidade, indicando que o estresse subletal é capaz de modificar a capacidade de *S. aureus* formar biofilme geralmente no sentido de aumentar esta capacidade.

Tabela 2 - Capacidade de formação de biofilme por isolados de *S. aureus* após serem submetidos a diferentes tipos de estresse subletal.

Isolados	Calor	Frio	pH ácido	Salinidade
Fortes formadores				
1	Forte	Forte	Forte	Moderado*
2	Forte	Forte	Forte	Moderado*
3	Forte	Forte	Forte	Forte
Não formadores				
4	Moderado*	Fraco*	Fraco*	Moderado*
5	Não	Não	Não	Não
6	Fraco*	Fraco*	Não	Fraco*

*Isolados que alteraram sua capacidade de formar biofilme após exposição ao estresse subletal.

A capacidade de formar biofilme frente aos diferentes tipos de estresse subletal também depende do isolado, já que dos três não formadores, o isolado 5 manteve-se inalterado após submetido a todos os tipos de estresse e o isolado 4 alterou sua capacidade de formar biofilme de maneira mais intensa, passando da categoria de não formador para moderado formador quando submetido a dois diferentes tipos de estresses.

Segundo Rode et al. ⁴⁶, a formação de biofilme por *S. aureus* é pequena a 42°C quando exposta a diferentes tempos de incubação, porém, os resultados do nosso estudo indicam que, no geral, houve um aumento da formação de biofilme por isolados previamente considerados não formadores quando submetidos a 42°C por 45 min. Moreto et al. ⁴⁷ também verificaram que a presença de NaCl estimula a formação de biofilme, já que 57% (4/7) dos isolados por eles testados aumentaram sua capacidade de produzir biofilme quando submetidos a esse estresse. Zmantar et al. ⁴⁸ relataram que, em pH 5,0, ocorreu uma diminuição da formação de biofilme na maioria das cepas que testaram, o que não foi observado no nosso estudo, já que os isolados caracterizados como fortes formadores de biofilme mantiveram-se com essa classificação após submetidos ao estresse em ambiente ácido (pH 5,0).

O estresse subletal, ao induzir a formação de biofilme por isolados de *S. aureus*, pode levar à maior dificuldade de eliminação desse micro-organismo de superfícies, prejudicando a sanitização de equipamentos na indústria de alimentos, onde há exposição a esses estresses. Dessa maneira, *S. aureus* passaria a ser um potencial contaminante para os alimentos.

A verificação dos isolados de *S. aureus* quanto à sua capacidade de sobrevivência e multiplicação em alimentos experimentalmente contaminados demonstrou que tanto os isolados provenientes de leite cru bovino quando os de carcaças de suínos, foram capazes de sobreviver durante cinco dias em leite UHT e carne suína, respectivamente (Tabela 3). Os isolados 2 e 3 apresentaram uma pequena diminuição na

população, detectável estatisticamente, do primeiro para o segundo dia no isolado 2 e do dia zero para o dia quatro no isolado 3, entretanto, ambos permaneceram viáveis no alimento até o término do período acompanhado. Estes resultados indicam que os isolados testados não se multiplicaram no ambiente propiciado pelos alimentos sob a condição de refrigeração a qual estavam submetidos e que, por outro lado, os fatores presentes nestes alimentos e as condições ambientais por eles proporcionadas não afetaram a viabilidade dos micro-organismos.

Tabela 3 - Resultados das contagens de *S. aureus* (UFC/g ou UFC/mL) em leite bovino e carne suína experimentalmente contaminados (médias de três repetições).

Isolados	Dia 0	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5
Leite cru						
bovino						
1	28,3 ^{*a}	20,8 ^a	20,5 ^a	29,5 ^a	26,6 ^a	33,0 ^a
2	31,7 ^{ab}	55,3 ^a	16,0 ^b	28,3 ^{ab}	38,0 ^{ab}	26,3 ^b
3	323,3 ^a	266,7 ^{ab}	270,0 ^{ab}	230,0 ^{ab}	180,0 ^b	183,3 ^b
Carne						
suína						
4	40,0 ^a	200,0 ^a	30,0 ^a	56,7 ^a	31,7 ^a	43,3 ^a
5	310,0 ^a	263,3 ^a	106,7 ^a	223,3 ^a	236,7 ^a	266,7 ^a
6	246,7 ^a	263,3 ^a	280,0 ^a	300,0 ^a	223,3 ^a	160,0 ^a

*Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa no teste de Tukey ($P < 0,05$).

Para *S. aureus* se multiplicar em um determinado alimento, as necessidades nutricionais, como fonte de nitrogênio (aminoácidos), fonte de energia (carboidrato ou outra), fontes de vitaminas (tiamina e niacina) e minerais, devem ser atendidas. Além disso, as condições ambientais também devem ser adequadas, como atividade de água, pH, temperatura, entre outros. Consequentemente, a interação desses fatores irá determinar a multiplicação ou não do micro-organismo ⁴⁹. O aumento da população de *S. aureus* durante a estocagem do alimento que foi experimentalmente contaminado não era esperado, uma vez que a temperatura de 7°C utilizada não é favorável à multiplicação desse micro-organismo. Segundo estudo realizado por Valero et al. ⁵⁰, a multiplicação de *S. aureus* é inibida à temperatura de 7,5°C. No nosso estudo, a temperatura de 7°C foi utilizada a fim de similar as condições comumente adotadas nos domicílios para a manutenção da carne suína e do leite após ter a embalagem aberta, e também por ser esta a temperatura máxima permitida para o leite cru estocado em resfriadores nas propriedades rurais ⁵¹. Na cadeia produtiva do leite, a temperatura do mesmo no recebimento pela indústria deve ser de até 10°C ⁵². O principal objetivo dessa regulamentação é limitar o desenvolvimento da microbiota comumente

presente no leite cru, a qual pode ser constituída de micro-organismos patógenos ⁵², dentre eles, bactérias do gênero *Staphylococcus*, como *S. aureus* ⁵³. No nosso estudo, não houve a multiplicação de *S. aureus*, porém, apenas a capacidade do micro-organismo se manter viável nos alimentos durante a estocagem por pelo menos cinco dias já é uma preocupação para segurança alimentar, tendo em vista que os alimentos no mercado varejista e especialmente nos domicílios nem sempre são mantidos na temperatura apropriada. Adicionalmente, a sua presença nos alimentos constitui uma potencial fonte de contaminação para os manipuladores e também para outros alimentos que poderiam oferecer condições intrínsecas e de armazenamento propícias a sua multiplicação.

Após realizada a avaliação dos isolados quanto à sensibilidade à metilina, verificou-se que 42,9% (12/28) foram classificados como resistentes, e desses, 85,7% (6/7) eram isolados de leite e 28,6% (6/21) dos seguintes pontos do fluxograma de abate de suínos: pocilga de espera, reto, língua e suíno após evisceração.

Normanno et al. ⁵⁴ isolaram cepas de *S. aureus* resistentes à metilina em 3,75% (6/160) de amostras de leite cru bovino (4) e de queijo (2). Vanderhaeghen et al. ⁵⁵ observaram que 9,3% (11/118) dos isolados de *S. aureus* que testaram, todos oriundos de vacas com mastite, apresentaram resistência à metilina. Ainda, Teixeira ⁵⁶ verificou que 3,95% (11/278) dos isolados de *S. aureus* de leite cru bovino eram resistentes à metilina. Esses resultados diferem dos obtidos no presente estudo, no qual mais de 40% dos isolados de *S. aureus* foram resistentes à metilina, e desses, mais de 80% relacionados a leite. Falhas relacionadas à higienização de equipamentos e utensílios utilizados na obtenção do leite, bem como do ambiente da sala de ordenha, podem ter influenciado a presença do alto percentual de isolados resistentes à metilina.

Animais acometidos por mastite estafilocócica são potenciais veiculadores de *S. aureus* para seres humanos através do leite e derivados ⁵⁷. Uma vez ocorrida a transferência interespecie, esses micro-organismos podem disseminar-se ⁵⁸. A metilina não é um antimicrobiano comumente utilizado no tratamento de mastite, porém a transmissão de cepas de *S. aureus* resistentes à metilina entre bovinos leiteiros e trabalhadores das fazendas já foi relatada ⁵⁹. Além da possibilidade de transmissão desse micro-organismo entre seres humanos e animais, o ambiente também pode ser fonte de infecção para os animais, tendo em vista que *S. aureus* pode sobreviver por longos períodos de tempo em ambientes com condições de umidade e temperatura favoráveis ^{60, 61}. Em um estudo realizado por Lim et al. ⁶² na Coreia, foram isoladas cepas de *S. aureus* resistentes à metilina de teteiras, piso, cercas de proteção e do sistema de ventilação de propriedades leiteiras.

Estudos também têm identificado isolados de *S. aureus* resistentes à metilina provenientes de suínos. Segundo Khanna et al. ⁶³, 26% (27/105) dos isolados de *S. aureus* obtidos de suabes nasais e retais de suínos foram resistentes à metilina. Ainda, Gómez-Sanz et al. ⁶⁴ testaram isolados de *S. aureus* obtidos de suabes nasais desses animais e verificaram que 21% (11/53) apresentaram resistência à metilina.

Isolados resistentes à meticilina são resistentes a todos os antimicrobianos beta-lactâmicos ⁶⁵, o que dificulta o tratamento em casos de infecções ⁶⁶. A resistência de *S. aureus* isolados de alimentos à meticilina constitui um grave problema de saúde pública, tendo em vista que há risco de disseminação do micro-organismo na cadeia alimentar.

CONCLUSÃO

S. aureus isolados de suínos e leite cru bovino apresentam capacidade de formar biofilme, principalmente aqueles oriundos de leite cru bovino. Além disso, demonstram comportamentos distintos sob condições de estresse subletal. A exposição a diferentes tipos de estresse pode resultar no aumento da capacidade de formar biofilme por alguns isolados, mais expressivamente quando submetidos ao calor (42°C) e ambiente salino (5% de NaCl).

Os isolados oriundos de leite cru bovino e carcaças de suínos são capazes de sobreviver até pelo menos cinco dias em leite UHT e carne suína, respectivamente. Porém, não apresentam capacidade de multiplicação nesses alimentos sob refrigeração.

A grande maioria dos *S. aureus* isolados de leite cru (85,7%) apresentam resistência à meticilina. Já nas cepas encontradas no fluxograma de abate de suínos, este percentual é bem menor (28,6%).

REFERÊNCIAS

- 1- Bannerman, TL. *Staphylococcus*, Micrococcus and other catalase-positive cocci that aerobically. In: Murray PR. Manual of Clinical Microbiology. Washington: ASM Press; 2003. p. 384-404.
- 2- Nitzsche S, Zweifel C, Stephan R. Phenotypic and genotypic traits of *Staphylococcus aureus* strains isolated from pig carcasses. *Vet microbiol.* 2007; 120(3): 292-299.
- 3- Hasan AA, Hassawi DS, Al-Daghistani HI, Hawari AD. Molecular and Biochemical Identification of Coagulase Positive *Staphylococcus* Species Isolated from Human and Animal Sources in Jordan. *Int J Med Med Sci.* 2014; 47(1): 1491-1504.
- 4- Carmo LS, Dias RS, Linardi VR, Sena MJ, Santos DA, Faria ME, et al. Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in Minas cheese and raw milk in Brasil. *Food Microbiol.* 2002; 19(1): 9-14.
- 5- Asperger H. *Staphylococcus aureus*. In: Asperger H. The significance of pathogenic microorganisms in raw milk. Brussels: International Dairy Federation; 1994. p. 24-42.
- 6- Lancefield GA, Tatini SR. *Staphylococcus aureus*. In: Vandrzant, C. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. Washington: American Public Health Association; 1992. p. 1219.

- 7- Park CE, Aktar M, Rayman K. Nonespecific reactions of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay kit (tecre) for detection of staphylococcal enterotoxins in foods. *Appl Environ Microbiol.* 1992; 58(8): 2509-2512.
- 8- Wong ACL, Bergdoll MS. Staphylococcal food poisoning. In: Cliver DO, Riemann HP. Foodborne Diseases. Amsterdam: Academic Press; 2002. p. 231-248.
- 9- Quinn PJ, Markey BK, Carter ME, Donnelly WJ, Leonard FC. Veterinary Microbiology and Microbial Disease. 2 ed. Iowa: Wiley-blackwell; 2011.
- 10- Hennekinne J, De Buyser M, Dragacci S. *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. *FEMS Microbiol Rev.* 2012; 36(4): 815-836.
- 11- Jay JM. Microbiologia de Alimentos. 6 ed. Porto Alegre: Artmed; 2005.
- 12- Omoe K, Hu DL, Takahashi-Omoe H, Nakane A, Shinagawa K. Comprehensive analysis of classical and newly described staphylococcal superantigenic toxin genes in *Staphylococcus aureus* isolates. *FEMS Microbiol Lett.* 2005; 246(2): 191-198.
- 13- Germano PML, Germano MIS. Higiene e vigilância sanitária de alimentos. 5 ed. Barueri: Manole; 2015.
- 14- Santos SS. Investigação da presença e da formação de biofilmes por estafilococos em micro-usina de beneficiamento de leite [Investigation of the presence and formation of biofilms by staphylococci in milk processing micro-plants] [dissertation]. Joticabal (SP): Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”; 2009.
- 15- Honary S, Ebrahimi P, Hadianamrei R. Optimization of particle size encapsulation efficiency of vancomycin nanoparticles by response surface methodology. *Pharm Dev Technol.* 2014; 19(8): 987-998.
- 16- Lee SHI, Mangolin BLV, Gonçalves JL, Neeff DV, Silva MP, Cruz AG, et al. Biofilm-producing ability of *Staphylococcus aureus* isolates from Brazilian dairy farms. *J Dairy Sci.* 2014; 97(3): 1812-1816.
- 17- Costa KAD, Ferez M, Silveira SM, Millezi AF. Formação de biofilmes bacterianos em diferentes superfícies de indústrias de alimentos [Formation of bacterial biofilms on different surfaces of food industries]. *Rev Inst Laticínios Cândido Tostes.* 2016; 71(2): 75-82.
- 18- Parizzi SQF. Adesão bacteriana em superfície de serviços de alimentação hospitalar avaliada pela microscopia de epifluorescência [Bacterial surface adhesion of hospital feeding services evaluated by epifluorescence microscopy] [dissertation]. Viçosa (MG): Universidade Federal de Viçosa; 1998.
- 19- Donlan RM, Costerton JM. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev.* 2002; 15(2): 167-193.

- 20- Fuster-Valls N, Hernández-Herrero M, Marín-de-Mateo M, Rodríguez-Jerez JJ. Effect of different environmental conditions on the bacteria survival on stainless steel surfaces. *Food Control*. 2008; 19(3): 308-314.
- 21- Jefferson KK. What drives bacteria to produce a biofilm? *FEMS Microbiol Lett*. 2004; 236(2): 163-173.
- 22- Costerton WJ, Cheng KJ, Geesey GG, Ladd TI, Nickel JC, Dasgupta M, et al. Bacterial biofilms in nature and disease. *Ann Rev Microbiol*. 1987; 41: 435-464.
- 23- Chavant P, Gaillard-Martinie B, Talon R, Hébraud M, Bernardi T. A new device for rapid evaluation of biofilm formation potential by bacteria. *J Microbiol Methods*. 2007; 68(3): 605-612.
- 24- Intrakamha M, Komutarin T, Pimpukdee K, Aengwanich W. Incidence of enterotoxin-producing MRSA in bovine mastitis cases, bulk milk tanks and processing plants in Thailand. *J Anim Vet Adv*. 2012; 11(5): 655-661.
- 25- Rabelo MA, Bezerra AM, Loibman SO, Costa JLL, Ferreira EL, Leal NC, et al. The occurrence and dissemination of methicillin and vancomycin-resistant *Staphylococcus* in samples from patients and health professionals of a university hospital in Recife, State of Pernambuco, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2014; 47(4): 437-446.
- 26- Mimica MJ, Mendes CMF. Diagnóstico laboratorial da resistência à oxacilina em *Staphylococcus aureus*. *J Bras Patol Med Lab*. 2007; 43(6): 399-406.
- 27- Zurita J, Mejia C, Guzmán-Blanco M. Diagnóstico e teste de sensibilidade para *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina na América Latina [Diagnosis and sensitivity testing for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Latin America]. *Braz J Infect Dis*. 2010; 14(2): 97-106.
- 28- Moraes TP. Similaridade entre cepas de micro-organismos patogênicos isolados em leiteiras e de aves silvestres capturadas nestes estabelecimentos [Similarity between strains of pathogenic microorganisms isolated in dairies and of wild birds captured in these establishments] [dissertation]. Pelotas (RS): Universidade Federal de Pelotas; 2019. Forthcoming 2019.
- 29- Moreira LM. Fontes de contaminação de *Staphylococcus* coagulase positiva e *Yersinia enterocolitica* no fluxograma de abate de suínos [Sources of contamination of *Staphylococcus* coagulase positive and *Yersinia enterocolitica* in the swine slaughter flowchart] [dissertation]. Pelotas (RS): Universidade Federal de Pelotas; 2017.
- 30- Janssens JCA, Steenackers H, Robijns S, Gellens E, Levin J, Zhao H., et al. Brominated Furanones Inhibit Biofilm Formation by *Salmonella enterica* Serovar *Typhimurium*. *Appl Environ Microbiol*. 2008; 74(21): 6639-6648.

- 31- Stepanovic S, Vukovic D, Dakic I, Savic B, Svabic-Vlahovic M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J Microbiol Methods*. 2000; 40(2): 175-179.
- 32- Chang CM, Chiang ML, Chou CC. Responses of heat-shocked *Vibrio parahaemolyticus* to subsequent physical and chemical stresses. *J Food Protect*. 2004; 67(10): 2183-2188.
- 33- Wong HC, Peng PY, Han JM, Chang CY, Lan SL. Effect of mild acid treatment on the survival, enteropathogenicity, and protein production in *Vibrio parahaemolyticus*. *Infect Immun*. 1998; 66(7): 3066-3071.
- 34- Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol*. 1966; 45(4): 493-496.
- 35- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for microbial susceptibility testing, document M100-S25. Wayne: CLSI; updated in: 2015. Available from: <http://ljzx.cqrmhospital.com/upfiles/201601/20160112155335884.pdf>.
- 36- Zhang Y, Xu D, Shi L, Cai R, Li C, Yan H. Association between agr type, virulence factors, biofilm formation and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolates from pork production. *Front Microbiol*. 2018; 9: 1-12.
- 37- Nobre LMN. Caracterização fenotípica, genotípica e perfil de resistência antibiótica de *Staphylococcus aureus* isolados em suínos [Phenotypic characterization, genotypic and antibiotic resistance profile of *Staphylococcus aureus* isolated from swine] [dissertation]. Teresina (PI): Universidade Federal do Piauí; 2017.
- 38- Fox LK, Zadoks RN, Gaskins CT. Biofilm production by *Staphylococcus aureus* associated with intramammary infection. *Vet Microbiol*. 2005; 107(3): 295-299.
- 39- Oliveira M, Nunes SF, Carneiro C, Bexiga R, Bernardo F, Vilela CL. Time course of biofilm formation by *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* mastitis isolates. *Vet Microbiol*. 2007; 124(1): 187-191.
- 40- Melo PDC, Ferreira LM, Nader-Filho A, Zafalon LF, Godoy Vicente HI. Análise fenotípica e molecular da produção de biofilmes por estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas de casos de mastite subclínica bovina [Phenotypic and molecular analysis of biofilm production by strains of *Staphylococcus aureus* isolated from cases of bovine subclinical mastites]. *Biosci J*. 2012; 28(1): 94-99.
- 41- Melo PC. Estudo fenotípico e genotípico da produção de biofilmes por estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas dos casos de mastite subclínica bovina [Phenotypic and genotypic study of the production of biofilms by strains of *Staphylococcus aureus* isolated from cases of bovine subclinical mastites] [dissertation]. Jaboaticabal (SP): Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”; 2008.

- 42- Flach J, Karnopp C, Corção G. Biofilmes formados em matéria-prima em contato com leite: fatores de virulência envolvidos [Biofilms formed in raw material in contact with milk: virulence factors involved]. *Acta Sci Vet.* 2005; 33(3): 291-296.
- 43- Salustiano VC. Isolamento, ribotipagem e controle de *Bacillus cereus* após a pasteurização do leite [Isolation, ribotyping and control of *Bacillus cereus* after milk pasteurization] [thesis]. Viçosa (MG): Universidade Federal de Viçosa; 2007.
- 44- Silva GAV. Avaliação das condições de obtenção do leite e da ação de sanificantes no tanque de expansão em uma propriedade leiteira no município de Candeias/BA [Evaluation of the conditions of milk production and the action of sanitizers in the expansion tank in a dairy farm in the municipality of Candeias/BA] [dissertation]. Salvador (BA): Universidade Federal da Bahia; 2006.
- 45- Milan C, Agostinetti A, Conceição RCS, Gonzalez HL, Timm CD. Sanitizer resistance of biofilm-forming *Salmonella* isolated from meat products. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 2015; 67(2): 642-646.
- 46- Rode MT, Langsrud S, Holck A, Moreto T. Different patterns of biofilm formation in *Staphylococcus aureus* under food-related stress conditions. *Int J Food Microbiol.* 2007; 116(3): 372-383.
- 47- Moreto T, Hermansen L, Holck AL, Maan SS, Rudi K, Langsrud S. Biofilm formation and the presence of the intercellular adhesion locus *ica* among *Staphylococci* from food and food processing environments. *Appl Environ Microbiol.* 2003; 69(9): 5648–5655.
- 48- Zmantar T, Kouidhi B, Miladi H, Mahdouani K, Bakhrouf A. A Microtiter plate assay for *Staphylococcus aureus* biofilm quantification at various pH levels and hydrogen peroxide supplementation. *New Microbiol.* 2010; 33(2): 137-145.
- 49- Tatini SR. Influence of food environments on growth of *Staphylococcus aureus* and production of various enterotoxins. *J Milk Food Technol.* 1973; 36(11): 559-563.
- 50- Valero A, Pérez-Rodríguez F, Carrasco E, Fuentes-Alventosa JM, García-Gimeno RM, Zurera G. Modelling the growth boundaries of *Staphylococcus aureus*: Effect of temperature, pH and water activity. *Int J Food Microbiol.* 2009; 133(1): 186-194.
- 51- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Instrução Normativa nº 63 (Dec 29, 2011).
- 52- Jayarao BM, Pillai SR, Sawant AA, Wolfgang DR, Hegde NV. Guidelines for monitoring bulk tank milk somatic cell and bacterial counts. *J Dairy Sci.* 2004; 87(10): 3561-3573.
- 53- Lafarge V, Ogier JC, Girard V, Maladen V, Leveau JY, Gruss A, et al. Raw cow milk bacterial population shifts attributable to refrigeration. *Appl Environ Microbiol.* 2004; 70(9): 5644-5650.

- 54- Normanno G, Corrente M, La Salandra G, Dambrosio A, Quaglia NC, Parisi A, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in foods of animal origin product in Italy. *Int J Food Microbiol.* 2007; 117(2): 219-222.
- 55- Vanderhaeghen W, Hermans K, Haesebrouck F, Butaye P. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in food production animals. *Epidemiol Infect.* 2010; 138(5): 606-625.
- 56- Teixeira JP, Silva N, Fonseca LM, Costa GM. Uso de PCR Duplex para detecção dos genes femA e mecA e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) em *Staphylococcus aureus* isolados de leite cru [Use of duplex PCR for detection of femA and mecA genes and determination of minimum inhibitory concentration (MIC) in *Staphylococcus aureus* isolated from raw milk]. *Rev Inst Adolfo Lutz.* 2014; 73(3): 272-279.
- 57- Adams MR, Moss MO. Food Microbiology. 3 ed. London: Royal Society of Chemistry; 2008.
- 58- Lee JH. Methicillin (oxacillin) – resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from major food animals and their potential transmission to humans. *App Environm Microbiol.* 2003; 69(11): 6489-6494.
- 59- Juhász-Kaszanyitzky E, Jánosi S, Somogyi P, Dán Á, Van Bloois LG, Vam Duijkeren E, et al. MRSA transmission between cows and humans. *Emerg Infect Dis.* 2007; 13(4): 630-632.
- 60- Kluytmans JA. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in food products: cause for concern or case for complacency? *Clin Microbiol Infect.* 2010; 16(1): 11-15.
- 61- Jorda GB, Marucci RS, Guida AM, Pires PS, Manfredi EA. Portación y caracterización de *Staphylococcus aureus* en manipuladores de alimentos [Carrying and characterization of *Staphylococcus aureus* in food handlers]. *J Microbiol.* 2012; 44(2): 9-12.
- 62- Lim SK, Nam H, Jang G, Lee H, Jung S, Kim T. Transmission and persistence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in milk, environment and workers in dairy cattle farms. *Foodborne Pathog Dis.* 2013; 10(8): 731-736.
- 63- Khanna T, Friendship R, Dewey C, Weese JS. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* colonization in pigs and pig farmers. *Vet Microbiol.* 2008; 128(3): 298-303.
- 64- Gómez-sanz E, Torres C, Lozano C, Fernández-Pérez R, Aspiroz C, Ruiz-Larrea F, et al. Detection molecular characterization, and clonal diversity of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* CC398 and CC97 in Spanish slaughter pigs of different age groups. *Foodborne Pathog Dis.* 2010; 7(10): 1269-1277.
- 65- Lowy FD. *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med.* 1998; 339(8): 520-532.
- 66- Peacock SJ, Paterson GK. Mechanisms of MRSA resistance. *Annu Rev Biochem.* 2015; 84: 577-601.

3 Considerações Finais

Isolados de *S. aureus* apresentam capacidade de formar biofilme, principalmente aqueles oriundos de leite cru bovino. Além disso, os isolados testados demonstraram comportamentos distintos sob condições de estresse subletal. A exposição a diferentes tipos de estresse pode resultar na capacidade de formar biofilme por alguns isolados, mais expressivamente quando submetidos ao calor (42°C) e ambiente salino (5% de NaCl).

Tanto os isolados provenientes de leite cru bovino quanto os de carne suína demonstraram capacidade de sobrevivência nos alimentos testados durante cinco dias e sob refrigeração. Em contrapartida, não foram capazes de multiplicar-se.

Os isolados de *S. aureus* testados apresentam resistência à meticilina, sendo verificado um elevado nível de resistência em isolados oriundos de leite cru bovino.

Os resultados obtidos demonstram a importância da implantação de efetivas práticas de limpeza e sanitização de equipamentos e superfícies que entram em contato com o produto na indústria de alimentos, a fim de evitar condições sob as quais *S. aureus* seja capaz de sobreviver, se multiplicar e, por consequência, formar biofilme. Além disso, mostra-se importante a adoção de medidas preventivas quanto à transmissão de *S. aureus* que apresentam resistência à meticilina entre humanos, animais e ambiente.

A partir do conhecimento a respeito das características de *S. aureus*, torna-se possível a adoção dos procedimentos apropriados para evitar a contaminação dos alimentos por esta bactéria, evitando, conseqüentemente, a ocorrência de DTA.

Referências

ALEKISH, M. O.; QUDAH, K. M. A.; SALEH, A. A. Prevalence of antimicrobial resistance among bacterial pathogens isolated from mastitis in northern Jordan. **Revue de Médecine Vétérinaire**, v.164, n.6, p.319-326, 2013.

ANTUNES, L. C. A Linguagem das bactérias. **Ciência Hoje**, v.33, n.193, p.16-20, 2003.

ARGUDÍN, M. A.; DEPLANO, A.; MEGHRAOUI, A.; DODÉMONT, M.; HEINRICHS, A.; DENIS, O.; NONHOFF, C.; ROISIN, S. Bacteria from animals as a pool of antimicrobial resistance genes. **PubMed Central**, v.6, n.2, p.1-38, 2017.

ASPERGER, H. The significance of pathogenic microorganisms in raw milk. **International Dairy Federation**, v.9405, p.24-42, 1994.

BALABAN, N.; RASOOLY, A. Staphylococcal enterotoxins. **International Journal of Food Microbiology**, v.61, n.1, p.1-10, 2000.

BANNERMAN, T. L. *Staphylococcus*, *Micrococcus* and other catalase-positive cocci that aerobically. In: **Manual of Clinical Microbiology**. Washington: Ed. da ASM Press, 2003. p.384-404.

BECKER, K.; KELLER, B.; EIFF, C.; BRUCK, M.; LUBRITZ, G.; ETIENNE, J.; PETERS, G. Enterotoxigenic potential of *Staphylococcus intermedius*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, n.12, p.5551-5557, 2001.

BERGDOLL, M. S. Symposium on microbiology update: old friends and new enemies. **Journal-Association of Official Analytical Chemists**, v.74, n.4, p.706-710, 1990.

BEZERRA, T. F. P.; PÁDUA, F. G. M.; OGAWA, A. I.; GEBRIM, E. M. M. S.; SALDIVA, P. H. N.; VOEGELS, R. L. Biofilme em rinossinusite crônica com polipose nasossinusal: estudo piloto. **Brazilian Journal of otorhinolaryngology**, v.75, n.6, p.788-93, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001. Aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2001.

BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; SILVA, M. A. S.; CARMO, R. A. Concentração mínima inibitória de dez antimicrobianos para amostras de *S. aureus* isoladas de infecção intramamária bovina. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.53, n.5, p.10-17, 2001.

CARMO, L. S.; DIAS, R. S.; LINARDI, V. R.; SENA, J. M.; SANTOS, A. D.; FARIA, E. M.; PENA, C. E.; JETT, M.; HENEINE, G. L. Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in Minas cheese and raw milk in Brazil. **Food Microbiology**, v.19, n.1, p.9-14, 2002.

CHAVANT, P.; GAILLARD-MARTINIE, B.; TALON, R.; HÉBRAUD, M.; BERNARDI, T. A new device for rapid evaluation of biofilm formation potential by bacteria. **Journal of Microbiological Methods**, v.68, n.3, p.605-12, 2007.

CHEN, J.; ROSSMAN, M. L.; PAWAR, D. M. Attachment of enterohemorrhagic *Escherichia coli* to the surface of beef and a culture medium. **Food Science and Technology**, v.40, n.2, p.249-254, 2007.

COSTA, G. M.; BARROS, R. A.; CUSTÓDIO, D. A. C.; PEREIRA, U. P.; FIGUEIREDO D. J.; SILVA, N. Resistência a antimicrobianos em *Staphylococcus aureus* isolados de mastite em bovinos leiteiros de Minas Gerais, Brasil. **Revista Arquivos do Instituto Biológico**, v.80, n.3, p.297-302, 2013.

COSTA, K. A. D.; FERENZ, M.; SILVEIRA, S. M.; MILLEZI, A. F. Formação de biofilmes bacterianos em diferentes superfícies de indústrias de alimentos. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v.71, n.2, p.75-82, 2016.

COSTERTON, J. W.; CHENG, K.J.; GEESEY, G. G.; Ladd, T.I.; NICKEL, J.C.; DASGUPTA, M.; MARRIE, T.J. Bacterial biofilms in nature and disease. **Annual Review of Microbiology**, v.41, p.435-464, 1987.

DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical Microbiology Review**, v.15, n.2, p.167-193, 2002.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Ed. Atheneu, 2005. p.182-183.

FREITAS, M. F. L.; PINHEIRO JÚNIOR, J. W.; STAMFORD, T. L. M.; RABELO, S. S. A.; SILVA, D. R.; SILVEIRA FILHO, V. M.; SANTOS, F. G. B.; SENA, M. J.; MOTA, R. A. Perfil de sensibilidade antimicrobiana in vitro de *Staphylococcus* coagulase positivos isolados de leite de vacas com mastite no agreste do Estado de Pernambuco. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.72, n.2, p.171-177, 2005.

FUSTER-VALLS, N.; HERNÁNDEZ-HERRERO, M.; MARÍN-DE-MATEO, M.; RODRÍGUEZ-JEREZ, J. J. Effect of different environmental conditions on the bacteria survival on stainless steel surfaces. **Food Control**, v.19, n.3, p.308-314, 2008.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 2015. p.1077-1078.

GIAOURIS, E.; HEIR, E.; HÉBRAUD, M.; CHORIANOPOULOS, N.; LANGSRUD, S.; MORETRO, T.; HABIMANA, O.; DESVAUX, M.; RENIER, S.; NYCHAS, G.J. Attachment and biofilm formation by foodborne bacteria in meat processing environments: Causes, implications, role of bacterial interactions and control by alternative novel methods. **Meat Science**, v.97, n.3, p.298-309, 2014.

GUIMARÃES, Felipe de Freitas. **Perfil de sensibilidade microbiana, pesquisa de gene mecA de resistência à meticilina e detecção molecular de genes codificadores de enterotoxinas, em espécies de estafilococos coagulase positiva e negativa, isolados de mastites bovinas**. 2011. 147f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Jaboticabal, 2011.

GUTIÉRREZ, D.; DELGADO, S.; VÁZQUEZ-SÁNCHEZ, D.; MARTÍNEZ, B., LÓPEZ, C. M.; RODRÍGUEZ, A.; HERRERA, J. J.; GARCÍA, P. Incidence of *Staphylococcus aureus* and analysis of associated bacterial communities on food industry surfaces. **Applied and Environmental Microbiology**, v.78, n.24, p.8547-8554, 2012.

GUTIERREZ, L. M.; GARCIA, L. M. L.; OTERO, A.; GARCIA, F. M. C.; MORENO, B. Incidence of staphylococci in ovine mastitic milk and antibiotic susceptibility of the strains. **Milchwissenschaft**, v.45, n.12, p.778-781, 1990.

HEILMANN, C. Adhesion mechanisms of staphylococci. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v.715, p.105-123, 2011.

HENNEKINNE, J.; DE BUYSER, M.; DRAGACCI, S. *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. **FEMS Microbiology Reviews**, v.36, n.4, p.815-836, 2012.

HONARY, S.; EBRAHIMI, P.; HADIANAMREI, R. Optimization of particle size encapsulation efficiency of vancomycin nanoparticles by response surface methodology. **Pharmacy Development Technology**, v.19, n.8, p.987-998, 2014.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Indicadores IBGE: Estatística da Produção Pecuária – Janeiro de 2018**. Disponível em: <https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/3087/epp_pr_2018_1tri.pdf> Acesso em: 30 jul. 2018.

INTRAKAMHA, M.; KOMUTARIN, T., PIMPUKDEE, K.; AENGWANICH, W. Incidence of enterotoxin-producing MRSA in bovine mastitis cases, bulk milk tanks and processing plants in Thailand. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v.11, n.5, p.655-661, 2012.

JAY, James. **Modern food microbiology**. Maryland: Aspen, 2000.

JEFFERSON, K. K. What drives bacteria to produce a biofilm? **FEMS Microbiology Letters**, v.236, n.2, p.163-173, 2004.

KADARIYA J., SMITH T. C., THAPALIYA D. *Staphylococcus aureus* and staphylococcal food-borne disease: an ongoing challenge in public health. **BioMed Research International**, v.827965, n.1, p.1-9, 2014.

KHANNA, T., FRIENDSHIP, R., DEWEY, C., & WEESE, J. S. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* colonization in pigs and pig farmers. **Veterinary microbiology**, v.128, n.3, p.298-303, 2008.

LANCETTE, G. A.; TATINI, S. R. *Staphylococcus aureus*. In: **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. Washington: American Public Health Association, 1992. p.1219.

LEE, S. H. I.; MANGOLIN, B. L. V.; GONÇALVES, J. L.; NEEFF, D. V.; SILVA, M. P.; CRUZ, A. G.; OLIVEIRA, C. A. F. Biofilm-producing ability of *Staphylococcus aureus* isolates from Brazilian dairy farms. **Journal of Dairy Science**, v.97, n.3, p.1812-1816, 2014.

LEJEUNE, J. T.; SCHULTZ, P. J. R. Unpasteurized milk: a continued public health threat. **Clinical Infectious Diseases**, v.48, n.1, p.93-100, 2009.

LOWY, F.D. *Staphylococcus aureus* infections. **The New England Journal of Medicine**, v.339, n.8, p.520-532, 1998.

LPSN. **List of prokaryotic names with standing in nomenclature**. Disponível em: <<http://www.bacterio.net/staphylococcus.html>> Acesso em: 03 ago. 2018.

LUCCHESI, Eliane Gama. **Desenvolvimento de sistema de obtenção de biofilmes in vitro e a avaliação de sua susceptibilidade a biocidas**. 2006. 91f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.

MEDEIROS, E. S.; MOTA, A. M.; SANTOS, M. V.; FREITAS, M. F. L.; PINHEIRO JÚNIOR, J. W.; TELES, J. A. A. Perfil de sensibilidade microbiana in vitro de linhagens de *Staphylococcus* spp. isoladas de vacas com mastite subclínica. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.29, n.7, p.569-574, 2009.

MURRAY, R.J. Recognition and management of *Staphylococcus aureus* toxin-mediated disease. **International Medicine Journal**, v.35, n.2, p.106-119, 2005.

NECIDOVÁ L.; STASTKOVÁ, Z.; POSPISILOVÁ M.; JANSTOVÁ, B.; STREJCEK, J.; DUSKOVÁ M.; KARPISKOVÁ R. Influence of soft cheese technology on the growth and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus*. **Czech Journal of Food Sciences**, v.27, n.2, p.127-133, 2009.

OMOE, K.; HU, D. L.; TAKAHASHI-OMOE, H.; NAKANE, A.; SHINAGAWA, K. Comprehensive analysis of classical and newly described staphylococcal superantigenic toxin genes in *Staphylococcus aureus* isolates. **FEMS Microbiology Letters**, v.246, n.2, p.191-198, 2005.

PARDI, M. C.; SANTOS, I. F.; SOUZA, E. R.; PARDI, H. S. **Ciência, Higiene e Tecnologia da carne**. Goiânia: UFG, 2006. p.623.

PARIZZI, S. Q. F. **Adesão bacteriana em superfície de serviços de alimentação hospitalar avaliada pela microscopia de epifluorescência**. 1998. 57f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1998.

PODPECAN, B.; PENGOV, A.; VADNJAL, S. The source of contamination of ground meat for production of meat products with bacteria *Staphylococcus aureus*. **Slovenian Veterinary Research**, v.44, n.2, p.24-30, 2007.

QUINN, P. J.; MARKEY, B.K.; CARTER, M.E.; DONELLY, W.J.; LEONARD, F.C. **Microbiologia Veterinária e doenças infecciosas**. Porto Alegre: Ed. Artmed, 2005. p.512.

QUINN, P.J; MARKEY, B.K., CARTER, M.E.; DONELLY, W.J.; LEONARD, F.C.; **Veterinary Microbiology and Microbial Disease**. Iowa: Wiley-blackwell, 2011. p.1231.

RABELO, M. A.; BEZERRA, A. M., LOIBMAN S. O.; COSTA, J. L. L.; FERREIRA, E.L.; LEAL, N.C.; MACIEL, M.A.V. The occurrence and dissemination of methicillin and vancomycin-resistant *Staphylococcus* in samples from patients and health professionals of a university hospital in Recife, State of Pernambuco, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.47, n.4, p.437-446, 2014.

RAIA JUNIOR, Roberto Bellezia. **Influência da mastite na ocorrência de resíduos antimicrobianos no leite**. 2001. 106f. Dissertação (Mestrado em Farmácia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

RIBEIRO, M. G. Princípios terapêuticos na mastite em animais de produção e de companhia. In: **Manual de Terapêutica Veterinária**. São Paulo: Roca, 2008. p.936.

ROÇA, R. O. **Composição Química da Carne**. Disponível em: <<http://www.fca.unesp.br/Home/Instituicao/Departamentos/Gestaoetecnologia/Teses/Roca102.pdf>> Acesso em: 31 jul. 2018.

ROMERO, M.; ACUÑA, L.; OTERO, A. Patents on quorum quenching: interfering with bacterial communication as a strategy to fight infections. **Recent patents on biotechnology**, v.6, n.1, p.2-12, 2012.

SANTOS, Suzy Sviech dos. **Investigação da presença e da formação de biofilmes por estafilococos em micro-usina de beneficiamento de leite**. 2009. 57f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Jaboticabal, 2009.

SCHLEIFER, K.; BELL, J. A. **Family VII I. *Staphylococcaceae* fam. nov.** Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Disponível em: <<http://www.springer.com/br/book/9780387950419>> Acesso em: 02 ago. 2018.

SHI, J.; MAO, N. F.; WANG, L.; ZHANG, H. B.; CHEN, Q.; LIU, H.; TANG, X.; JIN, T.; ZHU, C. T.; LI, F. B.; SUN, L. H.; XU, X. M.; XU, Y. Q. Efficacy of combined vancomycin and fosfomicin against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in biofilm in vivo. **PLOS One**, v.9, n.12, p.1-14, 2014.

SUS. **Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil.** 2018. Disponível em: <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/julho/02/Apresentacao-Surtos-DTA-Junho-2018.pdf>> Acesso em: 3 ago. 2018.

TETZNER T. A. D; BENEDETTI, E.; GUIMARÃES, E. C.; PERES, R. F. G. Prevalência de resíduos de antibióticos em amostras de leite cru na região de Triângulo Mineiro, MG. **Revista Higiene Alimentar**, v.19, n.130, p.69-72, 2005.

TEUBER M. Microbiological problems facing the dairy industry. **International Dairy Federation**, v.276, p.6-9, 1992.

TRANter, H.S. Foodborne staphylococcal illness. **Lancet**, v.336, n.8722. p.1044-1046, 1990.

USDA. United States Department of Agriculture. **Livestock and Poultry: World Markets and Trade.** Disponível em: <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/livestock_poultry.pdf> Acesso em: 01 ago. 2018.

VIANA, Eliseth de Souza. **Moléculas sinalizadoras de quorum sensing em biofilmes formados por bactérias psicrófilas isoladas de leite.** 2006. 159f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006. Disponível em:

WANG, X.; WANG, Y.; GUO, G.; USMAN, T.; HAO, D.; TANG, X.; ZHANG, Y.; YU, Y. Antimicrobial resistance and toxin gene profiles of *Staphylococcus aureus* strains from Holstein milk. **Letters in Applied Microbiology**, v.58, n.6, p.527-534, 2014.

WU, S.; DUAN, N.; GU, H.; HAO, L.; Y.E, H.; GONG, W.; WANG, Z. A Review of the Methods for Detection of *Staphylococcus aureus* Enterotoxins. **Toxins**, v.8, n.7, p.176-196, 2016.

ZANETTE, E.; SCAPIN, D.; ROSSI, E.M. Suscetibilidade antimicrobiana de *Staphylococcus aureus* isolados de amostras de leite de bovinos com suspeita de mastite. **Unoesc & Ciência - ACBS**, v.1, n.1, p.65-70, 2010.