

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



Dissertação

**Caracterização fenotípica e genotípica de *Staphylococcus aureus* isolados de
língua suína**

Kauana Kaefer

Pelotas, 2020

Kauana Kaefer

**Caracterização fenotípica e genotípica de *Staphylococcus aureus* isolados de
linguiça suína**

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, 2020

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

K11c Kaefer, Kauana

Caracterização fenotípica e genotípica de
Staphylococcus aureus isolados de linguiça suína / Kauana
Kaefer ; Cláudio Dias Timm, orientador. — Pelotas, 2020.

46 f.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação
em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade
Federal de Pelotas, 2020.

1. Linguiça suína . 2. Formação de Biofilme. 3.
Intoxicação alimentar. 4. Enterotoxinas estafilocócicas. 5.
Resistência à Meticilina. I. Timm, Cláudio Dias, orient. II.
Título.

CDD : 636.4

Kauana Kaefer

Caracterização fenotípica e genotípica de *Staphylococcus aureus* isolados de
linguiça suína

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: 20/02/2020

Banca examinadora:

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

Prof. Dr. Eliezer Ávila Gandra
Doutor em Ciência e Tecnologia Agroindustrial pela Universidade Federal de Pelotas

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

Profa. Dra. Rita de Cássia dos Santos da Conceição
Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Resumo

KAEFER, Kauana. **Caracterização fenotípica e genotípica de *Staphylococcus aureus* isolados de linguiça suína**. 2020. 46f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2020.

A linguiça suína é um alimento amplamente consumido, porém pode veicular microrganismos patogênicos como *Staphylococcus aureus*. Esse microrganismo pode causar intoxicação alimentar devido à sua capacidade de produzir enterotoxinas estafilocócicas. Além disso, isolados de *S. aureus* podem apresentar resistência a alguns antibióticos, como a meticilina, e também formar biofilme em diferentes superfícies utilizadas dentro da indústria de alimentos podendo essa capacidade ser afetada por condições ambientais. O objetivo do presente estudo foi verificar a presença de genes que codificam para a produção de enterotoxinas estafilocócicas em isolados de *S. aureus* provenientes de linguiças suínas e avaliar a resistência à meticilina, a capacidade de formação de biofilme em diferentes superfícies encontradas no processamento de alimentos e também avaliar a habilidade de formação de biofilme após estresses subletais. Foram coletadas 50 amostras de linguiça suína de açougues e supermercados da cidade de Pelotas - RS, realizadas contagens de *Staphylococcus* coagulase positiva (SCP) e obtidos isolados para identificação da espécie *S. aureus*. Nos isolados identificados como *S. aureus*, foi pesquisada a presença dos genes *sea*, *seb*, *sec* e *sed*, feita a avaliação da resistência à meticilina e testada a produção de biofilme em Ágar Vermelho Congo (CRA). Também foi verificada a capacidade dos isolados de *S. aureus* formarem biofilme após a exposição a estresses subletais (42 °C, 4 °C e pH 5,0). Os isolados de *S. aureus* classificados como produtores de biofilme considerados resistentes à meticilina e/ou que possuíam algum dos genes codificadores para a produção de enterotoxina estafilocócica pesquisados, foram avaliados quanto a formação de biofilme em aço inoxidável, polietileno, vidro e tripa suína. Das amostras testadas, 12% (6/50) apresentaram contagens de SCP acima do permitido pela legislação. *S. aureus* foi isolado de 44% (22/50) das amostras. Desses, 54% (12/22) possuíam apenas o gene *sed* e 32% (7/22) possuíam os genes *sec* e *sed*, 73% (16/22) foram resistentes à cefoxitina, sendo classificados como *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA), 62% (10/16) dos MRSA possuíam o gene *sed* e 25% (4/16) possuíam ambos os genes encontrados nesse estudo. Além disso, 68% (15/22) dos isolados de *S. aureus* foram considerados formadores de biofilme. Após serem submetidos aos estresses subletais, a maioria dos isolados formadores de biofilme continuou formando biofilme e os isolados não formadores de biofilme responderam de maneira distinta sendo observado que 57% (4/7) dos isolados passaram a formar biofilme após os estresses, dois isolados mantiveram-se inalterados e um isolado passou a formar biofilme apenas depois de ser exposto à temperatura de 4 °C. A condição de estresse subletal que mais induziu a formação de biofilme foi o frio. Sete isolados foram selecionados para avaliação da formação de biofilme nas superfícies. A produção de biofilme foi observada no aço inoxidável e na tripa suína em 71% (5/7) e 57% (4/7) dos isolados, respectivamente. Não houve

produção de biofilme em vidro e polietileno. Os resultados obtidos ressaltam a importância da implementação de boas práticas dentro da indústria e do comércio para controlar a contaminação microbiana e a formação de biofilme.

Palavras-chave: biofilme; metilina; intoxicação; enterotoxina

Abstract

KAEFER, Kauana. **Genotypic and phenotypic characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from pork sausage**. 2020. 46f. Dissertation (Master degree in Sciences) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2020.

Pork sausage is a widely consumed food, but it can carry pathogenic microorganisms such as *Staphylococcus aureus*. This microorganism can cause food poisoning due to its ability to produce staphylococcal enterotoxins. In addition, isolates of *S. aureus* may show resistance to some antibiotics, such as methicillin, and also form biofilm on different surfaces used in the food industry and this capacity may be affected by environmental conditions. The aim of the present study was to verify the presence of genes that code for the production of staphylococcal enterotoxins in *S. aureus* isolates from pork sausages and to evaluate methicillin resistance, the ability to form biofilms on different surfaces found in food processing and also to evaluate the ability of biofilm formation after sublethal stresses. Fifty samples of pork sausage were collected from butchers and supermarkets in the city of Pelotas - RS, counting of positive coagulase *Staphylococcus* (PCS) and obtained isolates to identify the species *S. aureus*. In the isolates identified as *S. aureus*, the presence of the *sea*, *seb*, *sec* and *sed* genes was investigated, methicillin resistance was evaluated and biofilm production was tested on Congo Red Agar (CRA). The ability of *S. aureus* isolates to form biofilm after exposure to sublethal stresses (42 °C, 4 °C and pH 5.0) was also verified. The isolates of *S. aureus* classified as biofilm producers considered to be resistant to methicillin and/or which had any of the genes coding for the production of staphylococcal enterotoxin investigated, were evaluated for the formation of biofilm in stainless steel, polyethylene, glass and swine casings. Of the samples tested, 12% (6/50) had SCP counts above that allowed by Brazilian law. *S. aureus* was isolated from 44% (22/50) of the samples. Of these, 54% (12/22) had only the *sed* gene and 32% (7/22) had the *sec* and *sed* genes, 73% (16/22) were resistant to cefoxitin, being classified as methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA), 62% (10/16) of the MRSA had the *sed* gene and 25% (4/16) had both genes found in the study and 68% (15/22) of *S. aureus* isolates were considered biofilm-forming. After being subjected to sublethal stresses, most of the biofilm-forming isolates continued to form biofilm and the non-biofilm isolates responded differently: it was observed that 57% (4/7) of the isolates started to form biofilm after the stresses, two isolates maintained unchanged and one isolate started to form biofilm only after being exposed to a temperature of 4 °C. The condition of sublethal stress that most induced the formation of biofilm was cold. Seven isolates were selected to evaluate the biofilm formation on the surfaces. Biofilm production was observed in stainless steel and swine casing in 71% (5/7) and 57% (4/7) of the isolates, respectively. There was no production of biofilm in glass and polyethylene. The results obtained underscore the importance of implementing good practices within industry and commerce to control microbial contamination and biofilm formation.

Keywords: biofilm; methicillin; intoxication; enterotoxin

Lista de Tabelas

Tabela 1	Capacidade de formação de biofilme por isolados de <i>S. aureus</i> após serem submetidos a diferentes tipos de estresse subletal	26
Tabela 2	Contagens e avaliação da formação de biofilme por <i>S. aureus</i> em diferentes superfícies ($\log/4\text{cm}^2$).	28

Sumário

1 Introdução.....	8
2 Artigo.....	16
3 Considerações Finais.....	37
Referências.....	38

1 Introdução

A carne suína é a proteína animal mais consumida mundialmente, seguida pela carne de aves e a carne bovina. Entretanto, esse padrão de consumo não é observado no Brasil, onde a maior demanda é pela carne de aves. A carne bovina e a carne suína apresentam, respectivamente, a segunda e a terceira opção proteica para os brasileiros (USDA, 2019).

No entanto, ainda que a carne suína não seja a mais consumida no Brasil, o mercado desse produto vem apresentando um crescimento contínuo, passando a ter uma maior participação na dieta dos brasileiros. Em 2018, o país produziu o equivalente a 3.974 milhões de toneladas de carne suína, sendo o quarto maior produtor, atrás apenas da China, da União Europeia e dos Estados Unidos (ABPA, 2019).

A riqueza nutritiva da carne suína está principalmente no conteúdo de proteínas de alto valor biológico, ácidos graxos monoinsaturados, vitaminas do complexo B (especialmente tiamina e riboflavina), ferro, selênio e potássio (MAGNONI e PIMENTEL, 2007). Porém, sua composição rica em nutrientes e sua elevada atividade de água, torna-a suscetível à deterioração microbiana, sendo frequentemente envolvida na disseminação de microrganismos patogênicos (BRASIL, 1997). Segundo o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (*Centers for Disease Control and Prevention*, CDC), entre 1998 e 2015, houve 288 surtos atribuídos ao consumo de carne suína, resultando em 6.372 pessoas doentes, 443 hospitalizações e quatro mortes nos Estados Unidos.

Nas últimas décadas, houve uma alteração na forma de consumo de carne, com a substituição do produto *in natura* por outros mais elaborados e de maior praticidade, como é o caso dos embutidos (BRUSTOLIN, 2014). Embutidos são os produtos cárneos elaborados com carne ou com órgãos comestíveis, curados ou não, condimentados, cozidos ou não, defumados e dessecados ou não, tendo como envoltório a tripa, a bexiga ou outra membrana animal, sendo permitido o emprego de envoltórios artificiais, desde que previamente aprovados pelo órgão regulador da

saúde (BRASIL, 2017). Dentre esses produtos destaca-se a linguiça frescal, devido à grande aceitação pelo mercado consumidor.

A produção de linguiça suína envolve várias etapas de manipulação, elevando o risco de contaminação por microrganismos patogênicos, como os do gênero

Staphylococcus, devido a falhas e não conformidades em seu processamento, podendo comprometer a qualidade higiênico-sanitária do alimento (MARQUES, 2006). Outras fontes prováveis de contaminação compreendem os envoltórios, temperos, condimentos e a água utilizada em todas as etapas de obtenção desse produto (CORTEZ et al., 2004).

Staphylococcus é um gênero de bactérias que pertencem a família Staphylococcaceae, são cocos Gram-positivos e podem se apresentar em pares, tétrades, agrupados irregularmente ou em forma de “cachos de uva” quando vistos ao microscópio. São bactérias mesófilas, apresentando temperatura de crescimento na faixa de 7 °C até 47,8 °C, com temperatura ótima de multiplicação aos 37 °C (FRANCO e LANDGRAF, 2008). Embora esse gênero possua 52 espécies, *S. aureus* é considerada a espécie mais relevante e a que está mais frequentemente associada a doenças estafilocócicas (LEE et al., 2018; FRANCO e LANDGRAF, 2008). O homem é um importante reservatório, podendo esse microrganismo ser encontrado nas fossas nasais e na pele de humanos e, a partir desses locais, alcançar outras regiões da pele e das mucosas (ROBERT e CHAMBERS, 2005). Assim, os manipuladores podem ser considerados uma importante fonte de contaminação de *S. aureus* aos alimentos.

A intoxicação alimentar por *Staphylococcus* é uma das doenças transmitidas por alimentos (DTA) mais comuns e é resultado da ingestão de enterotoxinas estafilocócicas (*Staphylococcal enterotoxins*, SE) pré-formadas nos alimentos, sendo *S. aureus* a espécie mais frequentemente implicada nesses casos (HENNEKINNE et al., 2012).

Atualmente, 23 enterotoxinas estafilocócicas já foram identificadas (WU et al., 2016). Essas enterotoxinas são proteínas básicas compostas de aproximadamente 220 a 240 aminoácidos e possuem baixo peso molecular. São resistentes ao aquecimento a 100 °C por 30 minutos, ou seja, um processo térmico como o cozimento não eliminaria essas toxinas do alimento, que continuaria a apresentar riscos aos consumidores (JAY, 2005).

Os fatores necessários para produção de enterotoxina dependem da atividade de água e da natureza do alimento, pH próximo a neutralidade, população bacteriana ($10^5 - 10^6$ UFC/g ou mL) e temperatura entre 10 °C e 45 °C (FONTE, 2012). Os sintomas de intoxicação alimentar normalmente se desenvolvem dentro de duas a quatro horas após a ingestão do alimento contaminado, sendo os principais sintomas: náusea, cólicas abdominais, vômito e diarreia (FRANCO e LANDGRAF, 2008). De acordo com Silva et al. (2017), doses inferiores a 1µg/kg já podem causar intoxicação, sendo esse valor atingido quando a população dessa bactéria alcança valores superiores a 10^6 UFC/g ou mL do alimento. As cinco primeiras SE descobertas (SEA, SEB, SEC, SED e SEE) são referidas como as enterotoxinas estafilocócicas clássicas e, geralmente, são as mais implicadas em surtos de intoxicação alimentar (LINA et al., 2004).

A SEA é a enterotoxina mais comumente associada a casos de surtos de intoxicação estafilocócica. A SEB é a toxina mais resistente ao calor e a ação de enzimas proteolíticas gastrointestinais, tais como a quimotripsina e tripsina. A SEC possui três subtipos: SEC1, SEC2 e SEC3, sendo os dois primeiros mais associados a casos de intoxicação envolvendo a SEC. A SED é o segundo sorotipo mais comum nas intoxicações alimentares, enquanto que a SEE é raramente relatada em alimentos e seu envolvimento em surtos também é pouco frequente (BHUNIA, 2008; ARGUDÍN et al., 2010).

Surtos de intoxicação alimentar devido à ingestão de produtos suínos contendo enterotoxinas produzidas por *S. aureus* já foram relatados (CDC, 1997; CDC, 1982; MICHELIN et al., 2006). De 2007 a 2017, a carne suína e os seus derivados contaminados com enterotoxina estafilocócica foram implicados em 30 surtos nos Estados Unidos, deixando 852 pessoas doentes (CDC, 2018). No Brasil, no período entre 2009 e 2018, *S. aureus* foi o terceiro agente etiológico mais identificado em surtos de doenças transmitidas por alimentos, atrás de *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. (BRASIL, 2019).

Para a identificação da produção de toxinas nos alimentos, podem ser utilizados métodos como testes em animais, testes sorológicos, cromatografia, imunoenaios e técnicas de biologia molecular (WU et al., 2016). O potencial para a produção de toxinas por uma determinada cepa pode ser determinado pela presença dos genes que codificam para a produção das toxinas, o que pode ser

conseguido com o uso da Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction*, PCR). Esta técnica consiste na detecção e amplificação *in vitro* de regiões específicas de ácidos nucleicos (DNA ou cDNA) (TYRRELL, 1997). A PCR é extremamente sensível e possibilita a amplificação de DNA a partir de uma mínima quantidade de amostra, tornando-se uma excelente ferramenta para pesquisa de genes que codificam para a produção de enterotoxinas (ZAHA, 2014; KONEMAN, 2001).

Outro problema que tem se tornado cada vez mais sério nas últimas décadas é a emergência e a disseminação de cepas de *Staphylococcus* resistentes a antimicrobianos. Inicialmente, a terapia antimicrobiana para infecções por *S. aureus* era simples. As penicilinas funcionaram bem até a década de 1960, época na qual começaram a aparecer isolados resistentes a esse antimicrobiano pela aquisição de um plasmídeo que codifica uma penicilinase (β -lactamase), enzima que inativa o antibiótico por hidrólise do anel β -lactâmico. Para contornar o problema, foi criado o beta-lactâmico sintético meticilina, que não era suscetível à ação das beta-lactamases produzidas pelo *S. aureus*. Entretanto, surgiram cepas resistentes também a esse antimicrobiano, devido a síntese da proteína ligadora de penicilina 2a (*penicillin-binding protein 2a*, PBP2a), codificada pelo gene *mecA*, que possui baixa afinidade aos antibióticos beta-lactâmicos. Essas cepas foram denominadas *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (*Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*, MRSA) e são resistentes a todos os antimicrobianos beta-lactâmicos (LOWY, 1998).

Animais domésticos podem abrigar a espécie *S. aureus*, sendo essa uma relevante causa de infecções na produção animal. Assim, é comum o uso de antibióticos com fins terapêuticos ou profiláticos (CERQUEIRA e ALMEIDA, 2013). Porém seu uso indiscriminado pode estimular o aparecimento de resistência a alguns antimicrobianos, dentre eles a meticilina. Como consequência da colonização e infecção por MRSA em animais de produção, destaca-se a possibilidade de contaminação dos produtos cárneos destinados ao consumo por esses microrganismos.

A contaminação dos alimentos por MRSA confere um risco de transmissão desse microrganismo às pessoas que manipularem estes alimentos, as quais podem infectadas em decorrência dessa contaminação. Além disso, pode ocorrer a

transferência de resistência dos MRSA às cepas de *S. aureus* suscetíveis à meticilina (MSSA).

Diversos métodos laboratoriais podem ser empregados para avaliar a sensibilidade *in vitro* de *S. aureus* frente à meticilina. Dentre eles, o teste de disco-difusão é um dos mais utilizados por ser um método prático, de fácil execução e idealizado para bactérias de crescimento rápido. Esse teste consiste na aplicação de um disco contendo o agente antimicrobiano na superfície da placa de ágar inoculada com suspensão bacteriana e, após o período de incubação, na avaliação do halo de inibição formado ou não em torno das colônias (ZURITA et al., 2010). Atualmente, para o teste de sensibilidade à meticilina, a cefoxitina passou a ser o antibiótico de escolha, uma vez que a meticilina não é mais fabricada. A oxacilina permanece como segunda opção de antibiótico para realização do teste, mas, de acordo com o Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais (*Clinical and Laboratory Standards Institute*, CLSI) (2015), o disco com cefoxitina deve ser preferido ao de oxacilina devido sua maior acurácia.

Além de estar envolvido constantemente em casos de intoxicação alimentar e da sua notória capacidade de criar resistência a antimicrobianos, *S. aureus* também é capaz de formar biofilme em diversas superfícies. Os biofilmes são estruturas comunitárias de bactérias envolvidas em uma matriz polimérica produzida pelas próprias bactérias e constituída de polissacarídeos, proteínas e ácidos nucleicos, denominados em conjunto de exopolissacarídeos (EPS), com capacidade de adesão a superfícies bióticas (como células e tecidos) ou abióticas (HAABER et al., 2012).

O processo de formação do biofilme se inicia com a adesão de bactérias planctônicas à uma superfície e, em seguida, ocorre a proliferação e o acúmulo de células em multicamadas e as bactérias passam a secretar as substâncias que formam a matriz. Após, ocorre o desenvolvimento precoce da arquitetura do biofilme e sua maturação. A última etapa consiste no descolamento de células ou de agregados celulares, deixando as bactérias livres e aptas a colonizar novas superfícies, reiniciando o processo (STOODLEY et al., 2002; CUE et al., 2012; JOO e OTTO, 2012). Desse modo, os biofilmes são uma importante fonte de contaminação que pode causar danos à qualidade e à segurança dos alimentos (JOSEPH et al., 2001). Aço inoxidável, polietileno e vidro são superfícies abióticas comumente presentes nas indústrias de alimentos e são passíveis de formação de

biofilme. Se formados em materiais da linha de produção dessas indústrias podem acarretar, além do risco à saúde do consumidor já citado, prejuízo financeiro à indústria (FLACH et al., 2005).

A produção de biofilme por espécies de *Staphylococcus* é dependente de algumas adesinas. Na fase proliferativa, a principal delas é o polissacarídeo de adesão intercelular (*Polyssacharide Intercellular Adhesin*, PIA), responsável pela adesão celular, codificado por genes do operon *icaADBC*, composto de quatro genes, *icaA*, *icaD*, *icaC* e *icaB*. Outra proteína presente na membrana celular de algumas espécies de *Staphylococcus* que também possui importante papel na formação de biofilme é a proteína associada à formação de biofilme (*Biofilm-associated protein*, BAP) e está envolvida na fixação primária, bem como na adesão intercelular pelos microrganismos, e é codificada pelo gene *bap* (PLANCHON et al., 2006).

As bactérias aderidas em biofilmes resistem melhor às condições desfavoráveis do ambiente, incluindo estresses causados por estímulos externos como dessecação, radiação ultravioleta, tratamentos com antibióticos e sanitizantes (HERRERA et al., 2007; PARSEK e FUQUA, 2004). Estudos *in vitro* relatam que células bacterianas organizadas em biofilmes podem tornar os antimicrobianos 10 a 1.000 vezes menos eficazes se comparadas com as células planctônicas dos mesmos isolados (HOIBY et al., 2010; SHAFABI e VAFAI, 2010; ANTUNES et al., 2011).

Em decorrência da maior resistência oferecida pelo biofilme, as células geralmente não são removidas pelo procedimento de lavagem normal. Assim, deve-se preconizar a prevenção da formação de biofilme efetuando a correta higienização de utensílios, superfícies e equipamentos antes e após o processamento dos alimentos na indústria (GERMANO e GERMANO, 2015).

Podem ser utilizados diferentes métodos para detecção da formação de biofilme (KIRMUSAOGLU, 2019). Um método presuntivo bastante utilizado para a detecção da produção de biofilme por *Staphylococcus* spp. é a inoculação em Ágar Vermelho Congo (*Congo Red Agar*, CRA). Essa técnica foi descrita por Freeman et al. (1989), sendo de fácil execução, rápida, sensível e reprodutível. Baseia-se no cultivo de isolados de *Staphylococcus* em ágar BHI (*Brain Heart Infusion*, Infusão de

Cérebro e Coração) adicionado de 5% de sacarose e de 0,08% do corante vermelho congo. A leitura das placas é feita após a incubação. São considerados formadores de biofilme os isolados que apresentarem colônias rugosas da coloração preta e não formadores de biofilme os isolados que apresentarem colônias lisas e rosas. As alterações na coloração do meio de cultivo são resultantes da ligação do corante ao exopolissacarídeo bacteriano, cuja produção é intensificada pelo suplemento nutricional do meio (FREEMAN et al., 1989).

O objetivo do presente estudo foi verificar a presença de genes que codificam para a produção de enterotoxinas estafilocócicas em isolados de *Staphylococcus aureus* provenientes de linguiças suínas e avaliar algumas características fenotípicas dos isolados, como resistência à meticilina e capacidade de formação de biofilme em diferentes superfícies e sob distintas condições ambientais.

2 Artigo

Caracterização fenotípica e genotípica de *Staphylococcus aureus* isolados de linguiça suína

Kauana Kaefer, Débora Silveira Rodrigues, Juliana Rosa Fernandes, Thaís
Gonçalves Gonçalves, Thamíris Pereira de Moraes, Cláudio Dias Timm

Submetido à revista Ciência & Saúde Coletiva

Caracterização fenotípica e genotípica de *Staphylococcus aureus* isolados de linguiça suína

[*Phenotypic and genotypic characterization of Staphylococcus aureus isolated from pork sausage*]

RESUMO

O objetivo do estudo foi caracterizar genotípica e fenotipicamente isolados de *S. aureus* provenientes de linguiças suínas. Foram coletadas 50 amostras de linguiça suína, realizadas contagens de *Staphylococcus* coagulase positiva e obtidos isolados para identificação da espécie *S. aureus*. Nos isolados, foi pesquisada a presença dos genes *sea*, *seb*, *sec* e *sed*, feita a avaliação da resistência a metilina e testada a produção de biofilme em Ágar Vermelho Congo, aço inoxidável, polietileno, vidro e tripa suína. Também foi verificada a capacidade de alguns isolados formarem biofilme após a exposição a estresses subletais. Das amostras testadas, 12% apresentaram contagens acima do permitido pela legislação. *S. aureus* foi isolado de 44% das amostras. Destes, 54% possuíam apenas o gene *sed* e 32% possuíam os genes *sec* e *sed*, 73% foram resistentes à cefoxitina, sendo classificados como *S. aureus* resistentes à metilina (MRSA). Dos MRSA 62% possuíam apenas o gene *sed* e 35% possuíam ambos os genes encontrados no estudo. Quanto a formação de biofilme em ágar vermelho congo, 68% dos isolados de *S. aureus* foram considerados formadores de biofilme. Após serem submetidos aos estresses subletais, a maioria dos isolados formadores de biofilme continuou formando biofilme e os isolados não formadores de biofilme responderam de maneira distinta. A condição de estresse subletal que mais induziu a formação de biofilme foi o frio. A produção de biofilme foi observada apenas no aço inoxidável e na tripa suína em 71% e 57% dos isolados testados, respectivamente. Assim, ressalta-se a importância da implementação de boas práticas dentro da indústria para controlar a contaminação microbiana e a formação de biofilme.

Palavras-chave: enterotoxinas, biofilme, estresse subletal, metilina

ABSTRACT

The aim of the study was to characterize genotypic and phenotypically isolates of *S. aureus* from pork sausages. Fifty pork sausage samples were collected, positive-coagulase *Staphylococcus* counts were performed and isolates were obtained to identify the specie *S. aureus*. In the isolates, the presence of the *sea*, *seb*, *sec* and *sed* genes was investigated, methicillin resistance was evaluated and the biofilm production was tested on Congo red agar, stainless steel, polyethylene, glass and pork casing. The ability of some isolates to form biofilm after exposure to sublethal stresses was also verified. Of the samples tested, 12% had counts above the maximum level allowed by the Brazilian legislation. *S. aureus* was isolated from 44% of the samples. Of these, 54% had only the *sed* gene and 32% had the *sec* and *sed* genes, 73% were resistant to ceftiofur, being classified as *S. aureus* methicillin-resistant (MRSA), 62% of the MRSA had the *sed* gene and 25% had both genes found in the study and 68% (15/22) of *S. aureus* isolates were considered biofilm-forming. After being subjected to sublethal stresses, most of the biofilm-forming isolates continued to form biofilm and the no biofilm-forming isolates responded differently. The condition of sublethal stress that most induced the formation of biofilm was cold. Biofilm production was observed only in stainless steel and swine casing in 71% and 57% of the tested isolates, respectively. Thus, the importance of implementing good practices in the industry to control microbial contamination and biofilm formation is emphasized.

Keywords: enterotoxin, biofilm, sublethal stresses, methicillin

INTRODUÇÃO

A carne suína é a proteína animal mais consumida mundialmente (USDA, 2019). Dentre os produtos industrializados fabricados a partir da carne suína destaca-se a linguiça por ser produzida através de um processamento simples e ter preço acessível. A linguiça é o produto cárneo obtido de carnes de diferentes espécies animais, condimentado, com adição ou não de ingredientes, embutido em envoltório natural ou artificial e submetido a processo tecnológico específico (Brasil, 2017).

Na produção da linguiça frescal, a carne é moída aumentando a superfície de exposição para a contaminação e o crescimento de microrganismos e, por ser um produto frescal, não sofre nenhum tratamento térmico que elimine ou reduza essa contaminação. Além disso, sua obtenção requer uma série de etapas de manipulação, o que eleva as possibilidades de contaminação, podendo comprometer a qualidade higiênico-sanitária do produto final caso ocorram falhas e não conformidades em seu processamento (Tutenel *et al.*, 2003). Dentre as bactérias que podem estar presentes no produto final, destaca-se o *Staphylococcus aureus*, comumente encontrado nas fossas nasais e na pele de humanos saudáveis e também de suínos (Robert e Chambers, 2005; Linhares *et al.*, 2015; Strube *et al.* 2018).

S. aureus é considerada a espécie mais relevante dentro do gênero *Staphylococcus* e a mais frequentemente associada a surtos de intoxicação alimentar devido a grande capacidade de produzir enterotoxinas que, quando ingeridas em quantidades suficientes, provocam náusea, vômitos, cólicas e diarreia (Lee *et al.*, 2018; Germano e Germano, 2015). As enterotoxinas estafilocócicas (*Staphylococcal enterotoxins*, SEs) são termorresistentes, portanto, uma vez pré-formadas no alimento não são eliminadas durante o processamento térmico (Franco e Landgraf, 2008).

Além disso, *S. aureus* se destaca por sua capacidade de desenvolver resistência a diferentes antimicrobianos de forma rápida e eficaz e, nesse contexto, *S. aureus* resistentes à meticilina (*Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*, MRSA) possuem grande relevância por apresentarem resistência também a todos os antibióticos beta-lactâmicos, os quais são comumente usados no tratamento de infecções causadas por esse microrganismo (De Buyser *et al.*, 2001; Lowy, 1998). A contaminação dos alimentos por MRSA confere um risco de transmissão desse microrganismo às pessoas que manipularem estes alimentos, as quais podem ser infectadas em decorrência dessa contaminação. Além disso, pode ocorrer a transferência de resistência dos MRSA às cepas de *S. aureus* suscetíveis à meticilina (MSSA). Outro fator preocupante é o fato de algumas cepas de *S. aureus* possuírem a capacidade de formar biofilme em diversas superfícies presentes na indústria de alimentos, como o aço inoxidável, o plástico e o vidro, podendo se tornar uma fonte persistente de contaminação microbiana que pode levar a deterioração do alimento e ameaçar a segurança dos produtos ao consumidor (Giaouris *et al.*, 2014). Os biofilmes são estruturas comunitárias de bactérias envolvidas em uma matriz polimérica produzida pelas próprias bactérias e constituída de polissacarídeos, proteínas e ácidos nucleicos, denominados em conjunto de

exopolissacarídeos (EPS), com capacidade de adesão a superfícies bióticas ou abióticas (Haaber *et al.*, 2012).

Durante o processamento dos alimentos, os microrganismos são submetidos a diversas condições de estresse como altas temperaturas, refrigeração e pH ácido que podem favorecer a formação de biofilme visto que a associação dos organismos em biofilmes constitui uma forma de proteção ao seu desenvolvimento, permitindo a sobrevivência em ambientes hostis (Donlan e Costerton, 2002).

O objetivo do presente estudo foi verificar a presença de genes que codificam para a produção de enterotoxinas estafilocócicas em isolados de *Staphylococcus aureus* provenientes de linguiças suínas e avaliar algumas características fenotípicas dos isolados, como resistência à metilina e capacidade de formação de biofilme em diferentes superfícies e sob distintas condições ambientais.

MATERIAL E MÉTODOS

Durante o período do estudo, foram coletadas 50 amostras de linguiça suína de açougues e supermercados localizados na cidade de Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil, totalizando 19 estabelecimentos, coletando-se até três amostras por local. As amostras foram acondicionadas em caixas isotérmicas com gelo e imediatamente encaminhadas ao laboratório para realização das análises.

Inicialmente, foi realizada a contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva (SCP) em Ágar Baird-Parker (Himedia, Mumbai, Índia) das amostras de linguiça, segundo Tallent *et al.* (2016). Após a prova da coagulase, um isolado coagulase positiva de cada amostra foi inoculado em Caldo Infusão de Cérebro e Coração (BHI, *Brain Heart Infusion*, Himedia, Índia) e incubado a 37 °C por 24 h. As culturas dos isolados em BHI foram adicionadas a 20% de glicerol para manutenção de estoque a -70 °C e posterior identificação de *S. aureus* por PCR.

A confirmação da espécie *S. aureus* foi realizada através da PCR, pesquisando a presença do gene *nuc*. A extração do DNA dos isolados positivos no teste da coagulase foi realizada conforme Sambrook e Russel (2001). Para a PCR, foi utilizado o protocolo relatado por Sasaki *et al.* (2010), com modificações. Cada reação de 25 µL continha 1 µL de DNA extraído, 2U de Taq DNA polimerase, 10 pmol de cada *primer*, 0,2 nM de desoxinucleosídeo trifosfato (dNTP) e tampão de reação. A amplificação foi realizada a 95 °C por 2 min, 30

ciclos de 95 °C por 30 s, 56 °C por 30 s e 72 °C por 1 min, e extensão final a 72 °C por 2 min. Os produtos da PCR foram corados com Diamond Nucleic Acid Dye (Promega, Estados Unidos) para visualização após a eletroforese em gel de agarose (Panreac Química SA, Espanha) a 1,5%.

Os isolados confirmados como *S. aureus* foram submetidos à PCR para identificação dos genes que codificam para as enterotoxinas estafilocócicas A (gene *sea*), B (gene *seb*), C (gene *sec*) e D (gene *sed*), separadamente. Foi utilizado o protocolo descrito por Cunha *et al.* (2007), com modificações, para a pesquisa dos genes codificadores para as enterotoxinas estafilocócicas de A a C. Em um microtubo foram adicionados, 20 pmol de cada *primer*, 2.5 U de Taq DNA polimerase, 200 µM de dNTPs, 20 mM de Tris-HCl, pH 8.4, 0.75 mM MgCl₂ e 5 µL de DNA. A amplificação consistiu em um primeiro ciclo de 94 °C por 4 min, desnaturação a 94 °C por 2 min, anelamento a 55 °C por 1 min e 30 s e extensão a partir dos oligonucleotídeos iniciadores a 72 °C por 1 min e 30 s, seguido por um segundo ciclo de desnaturação a 94 °C por 2 min, anelamento a 53 °C por 1 min e 30 s e extensão a 72 °C por 1 min e 30 s. No terceiro ciclo, a temperatura de anelamento foi reduzida a 51 °C, seguido por mais 37 ciclos a 94 °C por 2 min, 42,5 °C por 1 min e 30 s e 72 °C por 1 min e 30 s. Os produtos da PCR foram visualizados da forma anteriormente descrita. A pesquisa do gene codificador da enterotoxina estafilocócica D nos isolados foi realizada conforme descrito por Andretta (2019).

Para a avaliação da sensibilidade à meticilina foi realizado o teste de disco-difusão em Ágar Müeller-Hinton (Kasvi, Brasil), segundo Bauer *et al.* (1966), utilizando-se discos impregnados com o antibiótico cefoxitina 30µg (CFO). Os resultados foram avaliados segundo o Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais (*Clinical and Laboratory Standards Institute*, CLSI) (2015), que considera o microrganismo resistente à cefoxitina quando o halo formado possui diâmetro menor ou igual a 21 mm e sensível quando o halo possui diâmetro maior ou igual a 22 mm.

A produção de biofilme pelas cepas de *S. aureus* foi determinada pelo cultivo no Ágar Vermelho Congo (CRA, *Congo Red Agar*, Êxodo Científica, Brasil), conforme descrito por Freeman *et al.* (1989). A produção de colônias rugosas e negras foi considerada como resultado positivo para a formação de biofilme e a produção de colônias lisas e vermelhas como resultado negativo.

Foi avaliado o efeito de estresses subletais sobre a formação de biofilme em CRA. Os

isolados foram submetidos a diferentes tipos de estresse subletal. Para exposição das células ao choque de calor, culturas *overnight* em BHI foram mantidas em banho-maria a 42 °C por 45 min, segundo Chang *et al.* (2004). Para exposição ao choque de frio, culturas *overnight* em BHI foram mantidas a 4 °C durante 4 h (Silva, 2019). A exposição ao ambiente ácido foi realizada conforme descrito por Wong *et al.* (1998). Culturas *overnight* em BHI tiveram o pH ajustado para 5,0 com HCl 6N e foram incubadas a 37 °C durante 30 min.

Os isolados considerados formadores de biofilme no ágar CRA classificados como MRSA e/ou que possuíam pelo menos um gene codificador para a produção de enterotoxina estafilocócica, dentre os pesquisados, foram testados quanto à capacidade de formar biofilme em diferentes superfícies, conforme técnica utilizada por Milan *et al.* (2015), com modificações. Foram utilizados cupons com superfícies planas de 4 cm² de polietileno de alta densidade, aço inoxidável e vidro esterilizados em autoclave. Os cupons foram colocados dentro de placas de Petri (150 x 20 mm) contendo 100 mL de Caldo Triptona de Soja (TSB, *tryptone soya broth*, Acumedia, EUA) e 2 mL de cultura *overnight* de cada isolado padronizado em espectrofotômetro a 600 nm para 0,5 de densidade ótica. A cada 24 h de incubação a 37 °C, os cupons foram lavados suavemente duas vezes com solução salina tamponada com fosfato (PBS, 0,1 M, pH 7,0) para remoção de células não aderidas e novamente inseridas em placas de Petri com 100 mL de TSB, porém sem o inóculo, e incubadas. Após três repetições do procedimento, zaragatoas estéreis foram friccionadas sobre toda a superfície de cada cupom e colocadas em tubos de ensaio contendo 10 mL de PBS. A partir desta, foram feitas diluições seriadas para contagem dos microrganismos em ágar Baird-Parker. Um dos isolados não formadores de biofilme em ágar CRA foi utilizado como controle negativo.

Os isolados considerados formadores de biofilme no ágar CRA classificados como MRSA e/ou que possuíam pelo menos um gene codificador para a produção de enterotoxina estafilocócica também foram testados quanto à capacidade de formar biofilme em tripa suína. Foram utilizados pedaços de tripa suína desidratada esterilizados por imersão em álcool por 30 min e secagem em estufa a 60 °C. O restante do experimento foi realizado como descrito anteriormente. A contagem foi realizada através da fricção de uma zaragatoa em uma área de 4 cm² delimitada por um gabarito estéril.

Os experimentos de formação de biofilme em diferentes superfícies foram realizados em triplicata e as médias das contagens de *S. aureus* foram avaliadas por análise de variância e comparadas pelo teste de Tukey.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 50 amostras de linguiça suína crua analisadas, 48% (24/50) apresentaram SCP, sendo que 12% (6/50) apresentaram contagens de SCP acima do padrão estabelecido pela Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 12/01 (BRASIL, 2001) que admite contagens de SCP até $5,0 \times 10^3$ UFC/g para linguiças. A contagem máxima encontrada no presente estudo foi de $6,4 \times 10^4$ UFC/g. Resultado com percentual inferior ao encontrado no nosso trabalho foi relatado por Valiatti *et al.* (2016), que analisaram amostras de linguiças cruas oriundas de supermercados da cidade de Ji-Paraná, Rondônia, e constataram que 6,6% (2/30) apresentaram contagens de SCP acima do limite determinado pela legislação brasileira. Porém, uma prevalência maior foi relatada por Santa *et al.* (2012) que analisaram 50 amostras de linguiça suína e linguiça mista coletadas de indústrias no sul do Brasil e, dessas, 15 (30%) apresentaram SCP, sendo 11 (22%) amostras com contagens acima do limite estabelecido pela legislação. Já Botelho (2017) relata que das nove amostras de linguiça suína analisadas, coletadas de um frigorífico em Viçosa, Minas Gerais, todas apresentaram SCP, sendo esse fato atribuído à grande manipulação no preparo desse produto, porém nenhuma apresentou contagens superiores ao limite permitido. As altas contagens de *Staphylococcus* coagulase positiva encontradas no nosso estudo podem ser devido a condições higiênico-sanitárias impróprias durante a manipulação no preparo dos embutidos, a contaminação prévia da matéria-prima utilizada e/ou ao armazenamento em temperatura inadequada.

S. aureus foi isolado de 44% (22/50) das amostras. Em 92% (22/24) das amostras em que houve crescimento de SCP nas placas, foi identificado *S. aureus* e em todas as amostras cuja contagem foi superior ao permitido pela lei foi registrada a presença desse microrganismo.

Por *S. aureus* ser uma bactéria que se encontra naturalmente na pele e no trato respiratório superior do ser humano, pode-se atribuir a presença desse microrganismo nas amostras de linguiça pesquisadas à não adoção de medidas higiênico-sanitárias pelos manipuladores. Além disso, estudos têm relatado a presença de *S. aureus* na pele, nas tonsilas e no reto de suínos (Linhares *et al.*, 2015; Strube *et al.* 2018), indicando que esses animais podem albergar essa bactéria e, se não forem adotados os devidos cuidados durante o abate e no processamento da carne suína, esse microrganismo pode contaminar a carne e outras carcaças e equipamentos ou utensílios devido à contaminação cruzada. Essa também pode ser uma possível causa da presença de *S. aureus* nas amostras analisadas.

Dos isolados de *S. aureus*, 73% (16/22) foram resistentes à cefoxitina, sendo classificados como MRSA, o que significa que 32% (16/50) das amostras de linguiça estavam contaminadas por isolados resistentes a esse antimicrobiano. São poucos os estudos realizados para detecção de MRSA em linguiças suínas. Em estudo realizado por Botelho (2017), a resistência à metilina foi observada em 61,5% (8/13) dos isolados de *S. aureus* provenientes de sete amostras de linguiça suína, resultado aparentemente (o autor não deixa claro se todos os isolados, mesmo aqueles obtidos da mesma amostra, eram cepas distintas) semelhante ao observado no nosso estudo. Por outro lado, resultado abaixo ao encontrado foi relatado por Thapaliya *et al.* (2017), que relataram uma prevalência de 3,4% (10/293) de MRSA em linguiças suínas dentro das 293 amostras analisadas desse produto nos Estados Unidos. Independentemente da prevalência, a presença de MRSA em alimentos é considerada um risco à saúde humana.

Um fato adicional à possibilidade dos manipuladores serem portadores de MRSA e atuarem como fontes de contaminação no fluxograma de abate é que os suínos são considerados reservatórios de MRSA (Oppliger *et al.*, 2012) e, durante o abate de animais portadores, poderia ocorrer a contaminação das carcaças e demais produtos, inclusive por contaminação cruzada (Kluytmans, 2010).

Quanto à presença de genes codificadores para a produção das enterotoxinas estafilocócicas, 54% (12/22) possuíam apenas o gene *sed*, que codifica para a enterotoxina D e 32% (7/22) possuíam os genes *sec* e *sed*. Todos os isolados positivos para o gene *sec*, também foram positivos para o gene *sed*. Além disso, todas as amostras que obtiveram contagens de SCP acima do permitido pela legislação brasileira carregavam *S. aureus* positivo para o gene codificador da enterotoxina estafilocócica D. Não foi observada a ocorrência dos genes *sea* e *seb*.

Dos 16 isolados de MRSA, 87% (14/16) possuíam genes para produção de enterotoxinas, sendo que 62% (10/16) possuíam apenas o gene *sed* e 25% (4/16) possuíam ambos os genes encontrados no estudo. Dos 12 isolados de *S. aureus* que apresentavam apenas o gene *sed*, 83% (10/12) eram MRSA e dos sete isolados que apresentaram os genes *sec* e *sed*, 57% (4/7) eram MRSA.

Estudos envolvendo a presença de genes codificadores para SEs em linguiças têm verificado a presença de distintos genes ou combinações de genes nos isolados estudados. El-Maghraby *et al.* (2018) relataram a presença de isolados de *S. aureus* potenciais produtores

de *sea*, *seb*, *sec* e *sed*, provenientes de linguiças. Shylaja *et al.* (2018) e Sankomkai *et al.* (2020) constataram a presença de isolados de *S. aureus* oriundos de linguiças mistas e linguiça de porco fermentada, respectivamente, com os genes *sea* e *seb*, não sendo encontrados os genes *sec* e *sed* nos isolados, resultados contrários ao do presente estudo. As enterotoxinas estafilocócicas C e D já foram relatadas em vários casos de intoxicação alimentar estafilocócica envolvendo diferentes alimentos (Carmo *et al.*, 2002; Goulart *et al.*, 2016; Denayer *et al.*, 2017; Schmid *et al.*, 2009), evidenciando a importância dessas enterotoxinas na saúde pública.

A presença de genes que codificam para a produção de SE não indica que necessariamente o microrganismo irá produzir a toxina no alimento. No entanto, caso cepas enterotoxigênicas encontrem condições favoráveis à produção de enterotoxinas, estas serão produzidas no alimento oferecendo riscos à saúde pública. Em nosso estudo, foi encontrada uma alta prevalência de *S. aureus* enterotoxigênicos isolados de linguiça suína, resultado que indica que esse produto pode ser um veículo de intoxicação estafilocócica.

Em nosso estudo, 87% das cepas de MRSA eram potencialmente enterotoxigênicas. Percentual semelhante foi obtido por Savariraj *et al.* (2019) em que 94,3% (66/70) dos isolados de MRSA, oriundos de carne suína, possuíam algum gene para produção de enterotoxina, sendo relatada a presença dos genes *sea*, *seb*, *sec* e *sed* nas amostras estudadas, diferentemente do que foi encontrado em nosso estudo em que só os genes *sec* e *sed* foram observados. A avaliação da presença de genes enterotoxigênicos em isolados de MRSA tem sido estudada (Song *et al.*, 2016; Marques, 2017; Carfora *et al.*, 2015), porém é geralmente realizada com isolados provenientes de leite e derivados, sendo raros os relatos em produtos cárneos, especialmente em embutidos de carne suína.

A alta prevalência de MRSA e a presença de *S. aureus* enterotoxigênicos observados nesse estudo servem como um alerta à saúde pública sobre a necessidade de adoção de medidas de controle na cadeia de produção de alimentos para reduzir a contaminação dos produtos com esses microrganismos e assim diminuir o risco de transmissão às pessoas.

Dos 22 isolados de *S. aureus* obtidos, 68% (15/22) foram considerados formadores de biofilme pelo teste do CRA. Desses, 53% (8/15) eram MRSA e potencialmente enterotoxigênicos (possuindo o gene *sed* ou *sec+sed*), 40% (6/15) eram MRSA e possuíam apenas o gene *sed*, 13% (2/15) eram MRSA e possuíam os genes *sec* e *sed* simultaneamente, 13% (2/15) eram MRSA e não possuíam nenhum gene codificador para a produção de enterotoxinas estafilocócicas, 13% (2/15) não eram MRSA e possuíam apenas o gene *sed*,

13% (2/15) não eram MRSA e possuíam os genes *sec* e *sed* simultaneamente e 7% (1/15) não eram MRSA e não possuíam nenhum gene pesquisado.

Outros estudos já foram realizados para avaliar a formação de biofilme por *S. aureus* isolados de alimentos, porém não em isolados de linguiça suína, demonstrando que, embora seja um alimento muito consumido, ainda são necessários mais estudos acerca desse produto. Em trabalho realizado por Zhang *et al.* (2018), foram avaliados 130 isolados de *S. aureus* oriundos de granjas suínas, abatedouro e produtos suínos prontos e todos foram capazes de formar biofilme, prevalência maior do que a encontrada. Chen *et al.* (2020) também relataram maior prevalência, 72% (70/97) dos *S. aureus* isolados de diferentes alimentos, incluindo carne crua, foram capazes de formar biofilme.

A maioria dos isolados formadores de biofilme foi classificada como MRSA, 67% (10/15). Khan *et al.* (2011) também observaram que os isolados de MRSA testados foram mais propensos a formar biofilme do que *S. aureus* suscetíveis a meticilina (MSSA). Entretanto, outros estudos relatam não haver diferenças significativas entre a formação de biofilme por isolados MRSA e isolados MSSA (Reiter *et al.*, 2011; Smith *et al.*, 2008).

Após serem submetidas a estresses subletais, as cepas de *S. aureus* responderam de maneiras diferentes, como pode ser observado na Tabela 1. A grande maioria dos isolados formadores de biofilme, 80% (12/15), continuou formando biofilme após aplicação dos estresses. Um isolado formador de biofilme não formou biofilme em meio ácido e outro após o estresse ao calor e ao ambiente ácido. Apenas um isolado formador de biofilme deixou de apresentar essa capacidade após a exposição aos estresses subletais. Quanto aos isolados considerados não formadores de biofilme, após serem estressados, dois mantiveram-se inalterados. Porém, 57% (4/7) dos isolados considerados não formadores de biofilme passaram a formar biofilme após todos os estresses a que foram submetidos e um isolado não formador passou a formar biofilme somente após o estresse ao frio.

Tabela 1. Capacidade de formação de biofilme por isolados de *S. aureus* após serem submetidos a diferentes tipos de estresse subletal

Isolados	Calor	Frio	Ácido
Formadores de biofilme			
1	+	+	+
2	-	+	-
3	+	+	-
4	+	+	+
5	+	+	+
6	+	+	+
7	+	+	+
8	+	+	+
9	+	+	+
10	+	+	+
11	+	+	+
12	+	+	+
13	+	+	+
14	+	+	+
15	-	-	-
Não formadores de biofilme			
16	-	+	-
17	+	+	+
18	+	+	+
19	-	-	-
20	-	-	-
21	+	+	+
22	+	+	+

(+) com formação de biofilme; (-) sem formação de biofilme

O fato de que a maioria dos isolados não formadores de biofilme passou a formar biofilme após ser submetido a pelo menos um dos estresses testados indica que condições de

estresse induzem a formação de biofilme por *S. aureus*. Segundo Jefferson (2004), a razão da formação do biofilme é a defesa, sendo uma resposta contra condições de estresse.

A condição de estresse subletal que mais induziu a formação de biofilme pelos isolados utilizados no presente estudo foi o frio. Esse resultado é de significativa importância para a indústria de alimentos, visto que 4 °C é a temperatura recomendada para o armazenamento das linguiças suínas até seu consumo e, além disso, antes do embutimento há uma etapa crítica de descanso por 24 horas a 4 °C para se evitar a multiplicação de microrganismos no produto (Ordóñez *et al.*, 2005). Também no comércio varejista, restaurantes e domicílios, onde muitas vezes a manipulação é feita de forma menos cuidadosa, as linguiças costumam ser mantidas sob refrigeração, o que pode induzir a capacidade de formar biofilme por *S. aureus* que possam estar presentes no alimento.

Em nosso estudo, como já citado anteriormente, dois dos sete isolados não formadores de biofilme (29%) continuaram não formadores de biofilme, percentual semelhante ao relatado no trabalho de Silva (2019), que testou seis isolados de *S. aureus*, três isolados formadores de biofilme e três não formadores de biofilme, frente ao choque por calor, frio e ambiente ácido. Este autor relatou que todos os isolados formadores de biofilme continuaram formadores após os estresses e os isolados não formadores de biofilme, assim como no nosso estudo, se comportaram de maneiras distintas frente aos fatores estressantes, sendo que um dos isolados (1/3, 33%) não formou biofilme sob nenhuma das condições testadas.

Das cepas não formadoras de biofilme estudadas, 57% (4/7) passaram a produzi-lo após serem submetidas ao estresse por calor. Logo, o estresse ao calor pode ser considerado um fator que influencia a formação de biofilme. No entanto, Rode *et al.* (2007) afirmaram que, em seu estudo, a formação de biofilme por *S. aureus* após a exposição ao calor foi baixa.

Os resultados obtidos no presente trabalho, assim como em outros estudos avaliando o efeito de estresses subletais sob a formação de biofilme realizados com diferentes microrganismos (Rosa *et al.*, 2017; Galvão *et al.*, 2012; Lianou e Koutsoumanis, 2012), demonstram que cada microrganismo, assim como cada cepa de um mesmo microrganismo, apresenta suas particularidades frente a ambientes hostis, podendo formar ou não biofilme.

Dos 15 isolados produtores de biofilme em CRA, sete foram selecionados para a avaliação da formação de biofilme em aço inoxidável, vidro, polietileno e tripa suína, sendo dois MRSA com os genes *sec* e *sed*, três MRSA apenas com o gene *sed*, um MRSA não enterotoxigênico e um MSSA com os genes *sec* e *sed*.

A análise de variância das contagens em cada superfície mostrou não ter havido efeito da repetição. De acordo com a análise pelo teste de Tukey, houve produção de biofilme no

aço inoxidável e na tripa suína em 71% (5/7) e 57% (4/7) dos isolados, respectivamente. Não houve produção de biofilme em vidro e em polietileno (Tabela 2).

Tabela 2. Contagens de *S. aureus* em diferentes superfícies ($\log/4\text{cm}^2$) e avaliação da formação de biofilme

Isolados	Aço inoxidável (DP)	Vidro (DP)	Polietileno (DP)	Tripa suína (DP)
MRSA+sec+sed				
A	6,2 (0,8) [+]	5,9 (1,3) [-]	5,4 (1,15) [-]	4,3 (0,6) [-]
B	5,5 (0,3) [-]	5,1 (1,1) [-]	6,4 (0,60) [-]	6,0 (0,6) [-]
MRSA+sed				
C	5,9 (0,4) [+]	6,1 (0,4) [-]	4,6 (0,49) [-]	6,9 (0,7) [+]
D	6,5 (0,1) [+]	6,9 (0,4) [-]	6,5 (1,75) [-]	6,9 (0,0) [+]
E	5,8 (1,5) [+]	5,9 (0,9) [-]	5,5 (0,24) [-]	6,7 (0,8) [+]
MRSA				
F	5,6 (0,4) [-]	5,5 (0,4) [-]	4,8 (0,22) [-]	7,1 (0,3) [+]
MSSA+sec+sed				
G	7,0 (0,5) [+]	6,8 (0,7) [-]	5,8 (1,17) [-]	4,9 (0,3) [-]
Controle negativo	3,7 (1,0)	5,0 (1,1)	3,9 (0,9)	4,9 (0,7)

DP = desvio padrão; [+] com formação de biofilme; [-] sem formação de biofilme.

Nenhum dos isolados que testamos formou biofilme em outra superfície abiótica além do aço inoxidável. A formação de biofilme na superfície deste material também foi observada por outros autores que estudaram *S. aureus* isolados de diferentes alimentos (Di Ciccio *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2015; Friedriczewski *et al.*, 2018). Diferentemente dos nossos resultados, alguns estudos constataram a formação de biofilme por *S. aureus* em vidro e/ou polietileno (Lee *et al.*, 2015; Friedriczewski *et al.*, 2018). Esta diferença na capacidade de formar biofilme em vidro pode estar relacionada com as cepas e/ou com as características do alimento de onde foram isoladas.

A habilidade dos isolados de *S. aureus* testados de se aderirem e produzir biofilme em aço inoxidável confere uma grande preocupação para a indústria de alimentos, visto que esse é um material comumente presente em equipamentos e utensílios dentro das indústrias e, uma vez formado o biofilme, esse pode se tornar uma fonte de contaminação constante aos alimentos que com ele entram em contato.

Esse é o primeiro estudo relatando a capacidade de *S. aureus* produzir biofilme em tripa, sendo esse um achado relevante, pois uma vez que o biofilme esteja presente nesse envoltório, poderá contaminar outros alimentos, equipamentos e superfícies com os quais entrar em contato, além de representar um risco direto para quem o consome. Conforme Iñiguez-Moreno *et al.* (2018), o crescimento de microrganismos na superfície de alimentos é uma das causas principais de deterioração e perdas de produtos processados e *in natura*, e é também uma das principais causas de doenças de origem alimentar e danos aos equipamentos na indústria de alimentos. Além disso, o fato de todos os nossos isolados formadores de biofilme na tripa suína serem MRSA torna os riscos para a saúde pública ainda mais relevantes.

A presença dos genes *sec* e *sed*, a resistência à metilina ou a combinação desses fatores nos isolados estudados são mecanismos de patogenicidade que, somados a capacidade de formar biofilme, tornam a ocorrência de *S. aureus* em linguiças um problema ainda maior quanto à segurança dos consumidores.

CONCLUSÃO

S. aureus metilina resistentes e potenciais produtores das enterotoxinas estafilocócicas C e D podem ser isolados de linguiças suínas cruas e são capazes de formar biofilme, inclusive em superfícies como aço inoxidável e tripa suína. Algumas cepas de *S. aureus* não formadoras de biofilme, quando submetidos a determinadas condições de estresse, como a refrigeração, passam a desenvolver a capacidade de formar biofilme.

Esses resultados ressaltam a importância da implementação de boas práticas dentro da indústria para controlar a contaminação microbiana e a formação de biofilme.

REFERÊNCIAS

- ANDRETTA, M. *Serro artisanal cheese produced in brazil has a microbial safety status for consumers*. 2019. Dissertação (Mestrado em Veterinária) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2019.
- BAUER, A.W.; KIRBY, W.M.; SHERRIS, J.C.; TURCH, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single 457 disk method. *Am. J. Clin. Pathol.*, v. 45, n.4, p.493-496, 1966.
- BOTELHO, C.V. *Staphylococcus coagulase positiva e Staphylococcus aureus resistentes a antibióticos em cadeia produtiva de carne suína*. 2017. Dissertação (Mestrado em Veterinária) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2017.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Decreto nº 9.013, de 29 de março de 2017. Regulamento de inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 2017.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Resolução nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 2001.
- CARFORA, V.; CAPRIOLI, A.; MARRI, N. et al. Enterotoxin genes, enterotoxin production, and methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from milk and dairy products in Central Italy. *Int. Dairy J.*, v.42, p.12-15, 2015.
- CARMO, L.S.; DIAS, R.S.; LINARDI, V.R.; SENA, M.J.; SANTOS, D.A.; FARIA, M.E.; PENA, E.C.; JETT, M.; HENEINE, L.G. 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.
- CHANG, C.M.; CHIANG, M.L.; CHOU, C.C. Responses of heat-shocked *Vibrio parahaemolyticus* to subsequent physical and chemical stresses. *J Food Protect*, v.67, n.10, p.2183-2188, 2004.

CHEN, Q.; XIE, S.; LOU, X. Biofilm formation and prevalence of adhesion genes among *Staphylococcus aureus* isolates from different food sources. *MicrobiologyOpen*, v.9, n.1, 2020.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing - Twenty Fourth Informational Supplement. CLSI document M100-S24, 2015.

CUNHA, M.R.L.S.; CALSOLARI, R.A.O.; JÚNIOR, J.P.A. Detection of Enterotoxin and Toxic Shock Syndrome Toxin 1 Genes in *Staphylococcus*, with Emphasis on Coagulase-Negative Staphylococci. *Microbiol. and Immunol.*, v.51, n.4, p.381-390, 2007.

DE BUYSER, M.L.; DUFOUR, B.; MAIRE, M.; LAFARGE, V. Implication of milk and milk products in food-borne diseases in France and in different industrialised countries. *Int. J. Food Microbiol.*, v.67, n.1-2, p.1-17, 2001.

DENAYER, S.; DELBRASSINNE, L.; NIA, Y.; BOTTELDOORN, N. Food-borne outbreak investigation and molecular typing: high diversity of *Staphylococcus aureus* strains and importance of toxin detection. *Toxins*, v.9, n.12, p.407, 2017.

DI CICCIO, P.; VERGARA, A.; FESTINO, A.R. et al. Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* on food contact surfaces: Relationship with temperature and cell surface hydrophobicity. *Food Control*, v.50, p.930-936, 2015.

DONLAN R.M.; COSTERTON J.M. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Reviews*, v.15, n.2, p.167-193, 2002.

EL-MAGHRABY, M.S.; HASSAN, M.A.; HASSANIN, F.S.; SHAWKY, N.A. Detection of Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in Meat Product Sandwiches Using Multiplex PCR. *Benha Vet. Med. J.*, v.35, n.1, p.190-196, 2018.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. Microbiologia dos Alimentos. 2 ed. São Paulo: Atheneu, 2008. 182p.

FREEMAN, D.J.; FALKINER, F.R.; KEANE, C.T. New method for detecting slime production by coagulase-negative staphylococci. *J. Clin. Pathol.*, v.42, n.8, p.872–874, 1989.

FRIEDRICZEWSKI, A.B.; GANDRA, E.Á.; CERESER, N.D. et al. Biofilm Formation by Coagulase-Positive *Staphylococcus aureus* Isolated from Mozzarella Cheese Elaborated with Buffalo Milk and its Effect on Sensitivity to Sanitizers. *Acta Scient. Vet.*, v.46, n.1, p.6, 2018.

GALVÃO, N.N.; CHIARINI, E.; DESTRO, M.T. et al. PFGE characterisation and adhesion ability of *Listeria monocytogenes* isolates obtained from bovine carcasses and beef processing facilities. *Meat science*, v.92, n.4, p.635–643, 2012.

GERMANO, P.M.L.; GERMANO, M.I.S. Higiene e vigilância sanitária de alimentos. 5 ed. Barueri: Manole; 2015. 1088p.

GIAOURIS, E.; HEIR, E.; HÉBRAUD, M. et al. 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.

GOULART, A. R., LACERDA, I. C. A., DIAS, R. S. Potencial risco de intoxicação alimentar por *Staphylococcus* spp. enterotoxigênicos isolados de bolos com cobertura e recheio. **NBC-Periódico Científico do Núcleo de Biociências**, v.6, n.11, p.11-17, 2016.

HAABER, J.; COHN, M.T.; FREES, D. et al. Planktonic aggregates of *Staphylococcus aureus* protect against common antibiotics. *Plos One*, v.7, n.7, 2012.

IÑIGUEZ-MORENO, M.; GUTIÉRREZ-LOMELÍ, M.; GUERRERO-MEDINA, P.J.; AVILA-NOVOA, M.G. Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* spp. under mono and dual-species conditions and their sensitivity to cetrimonium bromide, peracetic acid and sodium hypochlorite. *Brazil. J. Microbiol.*, v.49, n.2, p.310-319, 2018.

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

KHAN, F.; SHUKLA, I.; RIZVI, M. et al. Detection of biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. Does it have a role in treatment of MRSA infections. *Trends Med. Res.*, v.6, n.2, p.116-123, 2011.

KLUYTMANS, J.A.J.W. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in food products: cause for concern or case for complacency?. *Clin. Microbiol. and infect.*, v.16, n.1, p.11-15, 2010.

LEE, A.; DE LENCASTRE, H.; GARAU, J. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nat. Rev. Dis. Primers*, v.4, n.1, p.1-23, 2018.

LEE, J.S.; BAE, Y.M.; LEE, S.; LEE, S.Y. Biofilm formation of *Staphylococcus aureus* on various surfaces and their resistance to chlorine sanitizer. *J. food science*, v.80, n.10, p.2279-2286, 2015

LIANOU, A.; KOUTSOUMANIS, K.P. Strain variability of the biofilm-forming ability of *Salmonella enterica* under various environmental conditions. *Int. J. of food microbiol.*, v.160, n.2, p.171–178, 2012.

LINHARES, L.L.; YANG, M.; SREEVATSAN, S. et al. The effect of anatomic site and age on detection of *Staphylococcus aureus* in pigs. *J. Vet. Diag. Invest.*, v.27, n.1, p.55-60, 2015.

LOWY, F.D. *Staphylococcus aureus* infections. *The New Engl. J. Med.*, v.339, n.8, p.520-532, 1998.

MARQUES, L.M.P. *Caracterização fenotípica e genotípica de Staphylococcus aureus isolados de queijo minas frescal*. 2017. 110f. Dissertação (Mestrado em Ciências Aplicadas em Produtos para a Saúde) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2017.

MILAN, C.; AGOSTINETTO, A.; CONCEIÇÃO, R.C.S. et al. Sanitizer resistance of biofilm-forming *Salmonella* isolated from meat products. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.67, n.2, p.642-646, 2015.

OPPLIGER, A.; MOREILLON, P.; CHARRIÈRE, N. et al. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* strains acquired by pig farmers from pigs. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.78, n.22, p.8010-8014, 2012.

ORDÓÑEZ, J.A. Tecnologia de alimentos: Alimentos de Origem Animal. 1 ed. Porto Alegre: ArtMed, 2005. 280p.

REITER, K.C.; DA SILVA PAIM, T.G.; DE OLIVEIRA, C.F.; D'AZEVEDO, P.A. High biofilm production by invasive multiresistant staphylococci. *Apmis*, v.119, n.11, p.776-781, 2011.

ROBERT, S.; CHAMBERS, S. Diagnosis and management of *Staphylococcus aureus* infections of the skin and soft tissue. *Int. Med. J.*, v.35, p.97-105, 2005.

RODE, M.T.; LANGSRUD, S.; HOLCK, A.; MORETRO, T. Different patterns of biofilm formation in *Staphylococcus aureus* under food-related stress conditions. *Int. J. Food Microbiol.*, v.116, n.3, p.372-383, 2007.

ROSA, J.V.; KAEFER, K.; CONCEIÇÃO, N.V.D. et al. Formação de biofilme por *Vibrio parahaemolyticus* isolados de pescados. *Pesq. Vet. Bras.*, v.37, n.4, p.339-345, 2017.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3 ed. Nova York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 999p

SANKOMKAI, W.; BOONYANUGOMOL, W.; KRAISRIWATTANA, K. et al. Characterisation of classical enterotoxins, virulence activity, and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from Thai fermented pork sausages, clinical samples, and healthy carriers in northeastern Thailand. *Journal of Veterinary Research*, v.1(ahead-of-print), 2020.

SANTA, O.R.D.; ALVAREZ, D.C.; SANTA, H.S.D. et al. Microbiota of sausages obtained by spontaneous fermentation produced in the South of Brazil. *Food Science and Tech.*, v.32, n.4, p.653-660, 2012.

SASAKI, T.; TSUBAKISHITA, S.; TANAKA, Y. et al. Multiplex- PCR method for species identification of coagulase- positive staphylococci. *J. Clin. Microbiol.*, v.48, n.3, p.765-769, 2010.

SAVARIRAJ, W.R.; RAVINDRAN, N.B.; KANNAN, P. et al. Prevalence, antimicrobial susceptibility and virulence genes of *Staphylococcus aureus* isolated from pork meat in retail outlets in India. *J. of food saf.*, v.39, n.1, 2019.

SCHMID, D.; FRETZ, R.; WINTER, P.; MANN, M.; HÖGER, G.; STÖGER, A.; RUPPITSCH, W.; LADSTÄTTER, J.; MAYER, N.; DE MARTIN, A.; ALLERBERGER, F. Outbreak of staphylococcal food intoxication after consumption of pasteurized milk products, June 2007, Austria. *Wiener Klinische Wochenschrift*, v.121, n.3-4, p.125-131, 2009.

SHYLAJA, M.; GOUD, S.S.S.; SAMATHA, K.; PRADEEP, C.H. Studies on the incidence of *Staphylococcus aureus* and its enterotoxins in different meat and meat products. *The Pharma J.*, v.7, n.4, 2018.

SILVA, J.R. *Caracterização fenotípica de Staphylococcus aureus isolados de alimentos de origem animal e de outras fontes relacionadas*. 2019. 39f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2019.

SMITH, K.; PEREZ, A.; RAMAGE, G. et al. Biofilm formation by Scottish clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *J. Med. Microbiol.*, v.57, n.8, p.1018-1023, 2008.

SONG, J.W.; YANG, S.J.; SHIN, S. et al. Genotypic and phenotypic characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitic milk in Korea. *J. food prot.*, v.79, n.10, p.1725-1732, 2016.

STRUBE, M.L.; HANSEN, J.E.; RASMUSSEN, S. A detailed investigation of the porcine skin and nose microbiome using universal and *Staphylococcus* specific primers. *Scient. Rep.*, v.8, n.1, p.1-9, 2018.

TALLENT, S.; HAIT, J.; BENNETT, R.W.; LANCETTE, G.A. *Staphylococcus aureus*. In: U.S. Food and Drug Administration, Bacteriological analytical manual, chap. 12, 2016.

Disponível em: < <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-staphylococcus-aureus>>. Acessado em: 9 jan. 2020.

THAPALIYA, D.; FORSHEY, B.M.; KADARIYA, J. et al. Prevalence and molecular characterization of *Staphylococcus aureus* in commercially available meat over a one-year period in Iowa, USA. *Food microbiol.*, v.65 p.122-129, 2017.

TUTENEL, A.V.; PIERAD, D.; HOFF, J.V. et al. Isolation and molecular characterization of *Escherichia coli* O157 isolated from cattle pigs and chickens at slaughter. *Int. J. Food Microbiol.*, v.84, n.1, p.63–69, 2003.

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> Acessado em: 05 jun. 2019.

VALIATTI, T. B.; BARCELOS, I.B.; CALEGARI, G.M. et al. Avaliação microbiológica de linguiças tipo frescal comercializadas em supermercados do município de Ji-Paraná, Rondônia. *Revist. Univers. Vale do Rio Verde*, v.14, n.2, p.678-686, 2016.

WONG, H.C.; PENG, P.Y.; HAN, J.M. et al. Effect of mild acid treatment on the survival, enteropathogenicity, and protein production in *Vibrio parahaemolyticus*. *Infect. Immun.*, v.66, n.7, p.3066-3071, 1998.

ZHANG, Y.; XU, D.; SHI, L. et al. Association between *agr* type, virulence factors, biofilm formation and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolates from pork production. *Front. in microbiol.*, v.9, p.1876, 2018.

3 Considerações Finais

A maioria das amostras de linguiça suína analisadas apresentou SCP e 12% das contagens se encontravam fora do padrão estabelecido pela legislação, o que evidencia falhas nas boas práticas de fabricação. *S. aureus* produtores das enterotoxinas C e D e *S. aureus* meticilina resistentes podem ser isolados de linguiças suínas, sendo sua presença em alimentos de elevada relevância uma vez que podem causar, respectivamente, intoxicação alimentar e baixo sucesso terapêutico em casos de infecções por MRSA.

Isolados de *S. aureus* são capazes de formar biofilme em aço inoxidável e tripa suína podendo permanecer mais tempo dentro da indústria e contaminar alimentos e utensílios que com ele entram em contato. A exposição dos isolados a estresses subletais, em geral, induziu a formação de biofilme por isolados não produtores, especialmente após serem submetidos ao estresse ao frio (4 °C), que é a temperatura normalmente utilizada para o armazenamento de linguiças suínas.

Os resultados obtidos devem servir como alerta para que sejam adotadas medidas para o controle e prevenção da contaminação e da formação de biofilme dentro da indústria, de forma a garantir que alimentos seguros cheguem ao consumidor.

Mais estudos devem ser realizados quanto a caracterização de *S. aureus* provenientes de linguiça suína tendo em vista que esse é um alimento amplamente consumido e ainda são poucos os dados na literatura envolvendo esse produto.

Referências

ABPA. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL. Relatórios anuais. Disponível em: <<http://abpa-br.com.br/setores/suinoicultura/publicacoes/relatorios-anuais/2019>> Acesso em: 05 jun. 2019.

ANDRETTA, M. **Serro artisanal cheese produced in brazil has a microbial safety status for consumers**. 2019. 47f. Dissertação (Mestrado em Veterinária) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2019.

ANTUNES, A.L.S.; BONFANTI, J.W.; PEREZ, L.R.R.; PINTO, C.C.F.; FREITAS, A. L.P.D.; MACEDO, A.J.; BARTH, A.L. High vancomycin resistance among biofilms produced by *Staphylococcus* species isolated from central venous catheters. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.106, n.1, p.51-55, 2011.

ARGUDÍN, M. A.; MENDOZA, M. C., RODICIO, M. R. Food Poisoning and *Staphylococcus aureus* Enterotoxins. **Toxins**, v.2, n.7, p.1751–1773, 2010.

BAUER, A.W.; KIRBY, W.M.; SHERRIS, J.C.; TURCH, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single 457 disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v.45, n.4, p.493-496, 1966.

BHUNIA, A. **Foodborne Microbial Pathogens – Mechanisms and Pathogenesis**. New York: Springer, 2008. 276p.

BOTELHO, C.V. **Staphylococcus coagulase positiva e Staphylococcus aureus resistentes a antibióticos em cadeia produtiva de carne suína**. 2017. Dissertação (Mestrado em Veterinária) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2017.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Decreto nº 9.013, de 29 de março de 2017. Regulamento de inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 2017.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Portaria nº368, de 04 de setembro de 1997. Regulamento técnico sobre as condições higiênico-sanitárias e de boas práticas de elaboração para estabelecimentos elaboradores/industrializadores de alimentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, p.60, 1997.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Resolução nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil - Informe de 2018. Disponível em: <<https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/maio/17/Apresentacao-Surtos-DTA-Maio-2019.pdf>> Acesso em: 05 jun. 2019.

BRUSTOLIN, J.C. **Avaliação da eficiência da descontaminação de carcaças suínas utilizando água sob pressão e ácido láctico**. 2014. 69f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, 2014. Disponível em: <http://www.uricer.edu.br/cursos/arq_trabalhos_usuario/2551.pdf> Acesso em: 05 jun. 2019.

CARFORA, V.; CAPRIOLI, A.; MARRI, N.; SAGRAFOLI, D.; BOSELLI, C.; GIACINTI, G.; GIANGOLINI, G.; SORBARA, L.; DOTTARELLI, S.; BATTISTI, A.; AMATISTE, S. Enterotoxin genes, enterotoxin production, and methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from milk and dairy products in Central Italy. **International Dairy Journal**, v.42, p.12-15, 2015.

CARMO, L.S.; DIAS, R.S.; LINARDI, V.R.; SENA, M.J.; SANTOS, D.A.; FARIA, M.E.; PENA, E.C.; JETT, M.; HENEINE, L.G. 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.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Annual Summaries of Foodborne Outbreaks. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/fdoss/annual-reports/index.html>> Acesso em: 02 nov. 2019.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Interstate Common Source Outbreaks of Staphylococcal Food Poisoning - North Carolina, Pennsylvania, 1982. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/00000061.htm>> Acesso em: 02 nov. 2019.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. National Outbreak Reporting System (NORS). Disponível em: <<https://wwwn.cdc.gov/norsdashboard/>> Acesso em: 18 nov. 2019.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Outbreak of Staphylococcal Food Poisoning Associated with Precooked Ham - Florida, 1997. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/00050415.htm>> Acesso em: 02 nov. 2019.

CERQUEIRA, E.S.; ALMEIDA, R.C.C. *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA) em alimentos de origem animal: uma revisão sistemática. **Revista Instituto Adolf Lutz**, v.72, n.4, p.268-281, 2013.

CHANG, C.M.; CHIANG, M.L.; CHOU, C.C. Responses of heat-shocked *Vibrio parahaemolyticus* to subsequent physical and chemical stresses. **Journal of Food Protection**, v.67, n.10, p.2183-2188, 2004.

CHEN, Q.; XIE, S.; LOU, X. Biofilm formation and prevalence of adhesion genes among *Staphylococcus aureus* isolates from different food sources.

MicrobiologyOpen, v.9, n.1, 2020.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing - Twenty Fourth Informational Supplement. CLSI document M100-S24, 2015.

CORTEZ, A.L.L.; CARVALHO, A.C.F.B.; AMARAL, L.A.; SALOTTI, B.M.; VIDAL-MARTINS, A.M.C. Fecal coliforms, coagulase positive staphylococci (CPS), *Salmonella* spp. and *Campylobacter* spp. in fresh sausage. **Alimentos e Nutrição**, v.15, n.2, p.215-220, 2004.

CUE, D.; LEI, M.G.; LEE, C.Y. Genetic regulation of the intercellular adhesion locus in staphylococci. **The Staphylococci and Staphylococcal Pathogenesis**, v.2, p.149, 2012.

CUNHA, M.R.L.S.; CALSOLARI, R.A.O.; JÚNIOR, J.P.A. Detection of Enterotoxin and Toxic Shock Syndrome Toxin 1 Genes in *Staphylococcus*, with Emphasis on Coagulase-Negative Staphylococci. **Microbiology and Immunology**, v.51, n.4, p.381-390, 2007.

DE BUYSER, M.L.; DUFOUR, B.; MAIRE, M.; LAFARGE, V. Implication of milk and milk products in food-borne diseases in France and in different industrialised countries. **International Journal of Food Microbiology**, v.67, n.1-2, p.1-17, 2001.

DENAYER, S., DELBRASSINNE, L., NIA, Y., & BOTTELDOORN, N. Food-borne outbreak investigation and molecular typing: high diversity of *Staphylococcus aureus* strains and importance of toxin detection. **Toxins**, v.9, n.12, p.407, 2017.

DI CICCIO, P.; VERGARA, A.; FESTINO, A.R.; PALUDI, D.; ZANARDI, E.; GHIDINI, S.; IANIERI, A. Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* on food contact surfaces: Relationship with temperature and cell surface hydrophobicity. **Food Control**, v.50, p.930-936, 2015.

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

EL-MAGHRABY, M.S.; HASSAN, M.A.; HASSANIN, F.S.; SHAWKY, N.A. Detection of Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in Meat Product Sandwiches Using Multiplex PCR. **Benha Veterinary Medical Journal**, v.35, n.1, p.190-196, 2018.

FLACH, J.; KARNOPP, C.; CORÇÃO, G. Biofilmes formados em matéria-prima em contato com leite: fatores de virulência envolvidos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.33, n.3, p.291-296, 2005.

FONTE, A.I.E. **Queijo de coalho do sertão alagoano: enterotoxigenicidade de *S. aureus* pela reação em cadeia da polimerase (PCR)**. 2012. 84p. Dissertação

(Mestrado em Engenharia Alimentar – Biotecnologia Microbiana) - Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, Portugal, 2012.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. 2 ed. São Paulo: Atheneu, 2008. 182p.

FREEMAN, D.J.; FALKINER, F.R.; KEANE, C.T. New method for detecting slime production by coagulase-negative staphylococci. **Journal of Clinical Pathology**, v.42, n.8, p.872–874, 1989.

FRIEDRICZEWSKI, A.B.; GANDRA, E.Á.; CERESER, N.D.; MOREIRA, L. M.; TIMM, C. D. Biofilm Formation by Coagulase-Positive *Staphylococcus aureus* Isolated from Mozzarella Cheese Elaborated with Buffalo Milk and its Effect on Sensitivity to Sanitizers. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.46, n.1, p.6, 2018.

GALVÃO, N.N.; CHIARINI, E.; DESTRO, M.T.; DE AGUIAR FERREIRA, M.; NERO, L.A. PFGE characterisation and adhesion ability of *Listeria monocytogenes* isolates obtained from bovine carcasses and beef processing facilities. **Meat science**, v.92, n.4, p.635–643, 2012.

GERMANO, P.M.L.; GERMANO, M.I.S. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos**. 5 ed. Barueri: Manole. 2015. 1088p.

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.

GOULART, A. R., LACERDA, I. C. A., DIAS, R. S. Potencial risco de intoxicação alimentar por *Staphylococcus* spp. enterotoxigênicos isolados de bolos com cobertura e recheio. **NBC-Periódico Científico do Núcleo de Biociências**, v.6, n.11, p.11-17, 2016.

HAABER, J.; COHN, M.T.; FREES, D.; ANDERSEN, T.J.; INGMER, H. Planktonic aggregates of *Staphylococcus aureus* protect against common antibiotics. **Plos One**, v.7, n.7, 2012.

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

HERRERA, J.J.R.; CABO, M.L.; GONZÁLEZ, A.; PAZOS, I.; PASTORIZA, L. Adhesion and detachment kinetics of several strains of *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* under three different experimental conditions. **Food Microbiology**, v.24, n.6, p.585-591, 2007.

HERZER, C. M. Toxic Shock Syndrome: Broadening the Differential Diagnosis. **The Journal of the American Board of Family Practice**, v.14, n.2, p.131-136, 2001.

HOIBY, N.; BJARNSHOLT, T.; GIVSKOV, M.; MOLIN, S.; CIOFU, O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.35, n.4, p.322-332, 2010.

IÑIGUEZ-MORENO, M.; GUTIÉRREZ-LOMELÍ, M.; GUERRERO-MEDINA, P.J.; AVILA-NOVOA, M.G. Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* spp. under mono and dual-species conditions and their sensitivity to cetrimonium bromide, peracetic acid and sodium hypochlorite. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.49, n.2, p.310-319, 2018.

JAY, J.M. **Microbiologia de alimentos**. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 711p.

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

JOO, H.; OTTO, M. Molecular basis of in vivo biofilm formation by bacterial pathogens. **Chemistry & Biology**, v.19, n.12, p.1503-1513, 2012.

JOSEPH, B., OTTA, S.K., KARUNASAGAR, I., KARUNASAGAR, I. Biofilm formation by *Salmonella* spp. on food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers. **International Journal Food Microbiology**, v.64, n.3, p.367-372, 2001.

KHAN, F.; SHUKLA, I.; RIZVI, M.; MANSOOR, T.; SHARMA, S.C. Detection of biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. Does it have a role in treatment of MRSA infections. **Trends Medical Research**, v.6, n.2, p.116-123, 2011.

KIRMUSAOGLU, S. The methods for Detection of Biofilm and Screening Antibiofilm Activity Agents. **Intech Open**, 2019.

KLUYTMANS, J.A.J.W. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in food products: cause for concern or case for complacency?. **Clinical microbiology and infection**, v.16, n.1, p.11-15, 2010.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C. **Diagnóstico Microbiológico**. 5 ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 2001. 1466p.

LAPPIN, E.; FERGUSON, A.J. Gram-positive toxic shock syndromes. **Lancet Infectious Disease**, v.9, n.5, p.281-290, 2009.

LEE, A.; DE LENCASTRE, H.; GARAU, J.; KLUYTMANS, J.; MALHOTRAKUMAR, S.; PESCHEL, A.; HARBARTH, S. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. **Nature Reviews Disease Primers**, v.4, n.1, p.1-23, 2018.

LEE, J.S.; BAE, Y.M.; LEE, S.; LEE, S.Y. Biofilm formation of *Staphylococcus aureus* on various surfaces and their resistance to chlorine sanitizer. **Journal of Food Science**, v.80, n.10, p.2279-2286, 2015.

LIANOU, A.; KOUTSOUMANIS, K.P. Strain variability of the biofilm-forming ability of *Salmonella enterica* under various environmental conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v.160, n.2, p.171-178, 2012.

LINA, G.; BOHACH, G.A.; NAIR, S.P.; HIRAMATSU, K.; JOUVIN-MARCHE, E.; MARIUZZA, R. Standard nomenclature for the superantigens expressed by *Staphylococcus*. **The Journal of Infectious Diseases**, v.189, n.12, p.2334-2336, 2004.

LINHARES, L.L.; YANG, M.; SREEVATSAN, S.; MUNOZ-ZANZI, C.A.; TORREMORELL, M.; DAVIES, P.R. The effect of anatomic site and age on detection of *Staphylococcus aureus* in pigs. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.27, n.1, p.55-60, 2015.

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

MAGNONI, D.; PIMENTEL, I. **A importância da carne suína na nutrição humana**. São Paulo: UNIFEST, 2007.

MARQUES, L.M.P. **Caracterização fenotípica e genotípica de *Staphylococcus aureus* isolados de queijo minas frescal**. 2017. 110f. Dissertação (Mestrado em Ciências Aplicadas em Produtos para a Saúde) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2017.

MARQUES, S.C.; BOARI, C.A.; BRCKO, C.C.; NASCIMENTO, A.D.; PICCOLI, R.H. Avaliação higiênico-sanitária de linguiças tipo frescal comercializadas nos municípios de Três Corações e Lavras - MG. **Ciência e Agrotecnologia**, v.30, n.6, p.1120-1123, 2006.

MICHELIN, A.D.F.; CARMO, L.S.D.; CARLOS, I.Z. Surto de intoxicação alimentar estafilocócica no município de Birigüi, São Paulo. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.65, n.1, p.46-49, 2006.

MILAN, C.; AGOSTINETTO, A.; CONCEIÇÃO, R.C.S.; GONZALEZ, H.L.; TIMM, C.D. Sanitizer resistance of biofilm-forming *Salmonella* isolated from meat products. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.67, n.2, p.642-646, 2015.

OPPLIGER, A.; MOREILLON, P.; CHARRIÈRE, N.; GIDDEY, M.; MORISSET, D.; SAKWINSKA, O. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* strains acquired by pig farmers from pigs. **Applied and Environmental Microbiology**, v.78, n.22, p.8010-8014, 2012.

ORDÓÑEZ, J.A. **Tecnologia de alimentos: Alimentos de Origem Animal**. 1 ed. Porto Alegre: ArtMed, 2005. 280p.

PARSEK, M.R.; FUQUA, C. Biofilms 2003: Emerging themes and challenges in studies of surface-associated microbial life. **Journal of Bacteriology**, v.186, n.14, p.4427-4440, 2004.

PLANCHON, S.; GAILLARD-MARTINIE, B.; DORDET-FRISONI, E.; BELLON-FONTAINE, M.N.; LEROY, S.; LABADIE, J.; TALON, R. Formation of biofilm by

Staphylococcus xylosus. **International Journal of Food Microbiology**, v.109, n.1-2, p.88-96, 2006.

REITER, K.C.; DA SILVA PAIM, T.G.; DE OLIVEIRA, C.F.; D'AZEVEDO, P.A. High biofilm production by invasive multiresistant staphylococci. **Apmis**, v.119, n.11, p.776-781, 2011.

ROBERT, S.; CHAMBERS, S. Diagnosis and management of *Staphylococcus aureus* infections of the skin and soft tissue. **International Medicine Journal**, v.35, p.97-105, 2005.

RODE, M.T.; LANGSRUD, S.; HOLCK, A.; MORETRO, T. Different patterns of biofilm formation in *Staphylococcus aureus* under food-related stress conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v.116, n.3, p.372-383, 2007.

ROSA, J.V.; KAEFER, K.; CONCEIÇÃO, N.V.D.; CONCEIÇÃO, R.; TIMM, C.D. Formação de biofilme por *Vibrio parahaemolyticus* isolados de pescados. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.37, n.4, p.339-345, 2017.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 3 ed. Nova York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 999 p

SANKOMKAI, W.; BOONYANUGOMOL, W.; KRAISRIWATTANA, K.; NUTCHANON, J.; BOONSAM, K.; KAEWBUTRA, S.; WONGBOOT, W. Characterisation of classical enterotoxins, virulence activity, and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from Thai fermented pork sausages, clinical samples, and healthy carriers in northeastern Thailand. *Journal of Veterinary Research*, v.1(ahead-of-print), 2020.

SANTA, O.R.D.; ALVAREZ, D.C.; SANTA, H.S.D.; ZANETTE, C.M.; FREITAS, R.J.S.D.; MACEDO, R.E.F.D.; TERRA, N.N. Microbiota of sausages obtained by spontaneous fermentation produced in the South of Brazil. **Food Science and Technology**, v.32, n.4, p.653-660, 2012.

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

SAVARIRAJ, W.R.; RAVINDRAN, N.B.; KANNAN, P.; PARAMASIVAM, R.; SENTHILKUMAR, T.M.A.; KUMARASAMY, P.; RAO, V.A. Prevalence, antimicrobial susceptibility and virulence genes of *Staphylococcus aureus* isolated from pork meat in retail outlets in India. **Journal of food safety**, v.39, n.1, 2019.

SCHMID, D.; FRETZ, R.; WINTER, P.; MANN, M.; HÖGER, G.; STÖGER, A.; RUPPITSCH, W.; LADSTÄTTER, J.; MAYER, N.; DE MARTIN, A.; ALLERBERGER, F. Outbreak of staphylococcal food intoxication after consumption of pasteurized milk products, June 2007, Austria. **Wiener Klinische Wochenschrift**, v.121, n.3-4, p.125-131, 2009.

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

SHAFABI, M.; VAFAI, K. Synthesis of biofilm resistance characteristics against antibiotics. **International Journal of Heat and Mass Transfer**, v.53, n.15-16, p.2943-2950, 2010.

SHYLAJA, M.; GOUD, S.S.S.; SAMATHA, K.; PRADEEP, C.H. Studies on the incidence of *Staphylococcus aureus* and its enterotoxins in different meat and meat products. **The Pharma Journal**, v.7, n.4, 2018.

SILVA, J.R. **Caracterização fenotípica de *Staphylococcus aureus* isolados de alimentos de origem animal e de outras fontes relacionadas**. 2019. 39f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2019.

SILVA, N., JUNQUEIRA, V. C. A., SILVEIRA, N. F. A., OKAZAKI, M. M. Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água. 5ª ed. São Paulo. Editora: Blucher, 2017.

SMITH, K.; PEREZ, A.; RAMAGE, G.; LAPPIN, D.; GEMMELL, C.G.; LANG, S. Biofilm formation by Scottish clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Medical Microbiology**, v.57, n.8, p.1018-1023, 2008.

SONG, J.W.; YANG, S.J.; SHIN, S.; SEO, K.S.; PARK, Y.H.; PARK, K.T. Genotypic and phenotypic characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitic milk in Korea. **Journal of food protection**, v.79, n.10, p.1725-1732, 2016.

STOODLEY, P.; DAVIES, G.; COSTERTON, J.W. Biofilms as complex differentiated communities. **Annual Reviews in Microbiology**, v.56, n.1, p.187-209, 2002.

STRUBE, M.L.; HANSEN, J.E.; RASMUSSEN, S.; PEDERSEN, K. A detailed investigation of the porcine skin and nose microbiome using universal and *Staphylococcus* specific primers. **Scientific reports**, v.8, n.1, p.1-9, 2018.

TALLENT, S.; HAIT, J.; BENNETT, R.W.; LANCETTE, G.A. ***Staphylococcus aureus***. In: U.S. Food and Drug Administration, Bacteriological analytical manual, chap. 12, 2016. Disponível em: < <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-staphylococcus-aureus> > Acesso em: 9 jan. 2020.

THAPALIYA, D.; FORSHEY, B.M.; KADARIYA, J.; QUICK, M.K.; FARINA, S.; O'BRIEN, A.; WARDYN, S. Prevalence and molecular characterization of *Staphylococcus aureus* in commercially available meat over a one-year period in Iowa, USA. **Food microbiology**, v.65 p.122-129, 2017.

TUTENEL, A.V.; PIERAD, D.; HOFF, J.V. CORNELIS, M.; DE ZUTTER, L. Isolation and molecular characterization of *Escherichia coli* O157 isolated from cattle pigs and chickens at slaughter. **International Journal of Food Microbiology**, v.84, n.1, p.63–69, 2003.

TYRRELL, D.A.J. Polymerase chain Reaction: identifies genes and infectious agents. **BMJ**, v.324, n.4, p.4–9, 1997.

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: 05 jun. 2019.

VALERO, A.; PÉREZ-RODRÍGUEZ, F.; CARRASCO, E.; FUENTES-ALVENTOSA, J.M.; GARCÍA-GIMENO, R.M.; ZURERA, G. Modelling the growth boundaries of *Staphylococcus aureus*: Effect of temperature, pH and water activity. **International Journal of Food Microbiology**, v.133, n.1-2, p.186-194 2009.

VALIATTI, T. B.; BARCELOS, I.B.; CALEGARI, G.M.; SILVA, W.M.C.; DE ALMEIDA, F.K.V.; DOS PRAZERES, P.F.L.; GASPAROTTO, P.H.G. Avaliação microbiológica de linguiças tipo frescal comercializadas em supermercados do município de Ji-Paraná, Rondônia. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v.14, n.2, p.678-686, 2016.

WONG, H.C.; PENG, P.Y.; HAN, J.M.; CHANG, C.Y.; LAN, S.L. Effect of mild acid treatment on the survival, enteropathogenicity, and protein production in *Vibrio parahaemolyticus*. **Infection and Immunity**, v.66, n.7, p.3066-3071, 1998

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

ZAHA, A.; FERREIRA, H.B.; PASSAGLIA, L.M.P. **Biologia molecular básica**. 3 ed. Porto Alegre: ArtMed, 2014. 424p.

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. **Frontiers in microbiology**, v.9, p.1876, 2018.

ZURITA, J.; MEJIA, C.; GUZMAN-BLANCO, M. Diagnóstico e teste de sensibilidade para *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina na América Latina. **Brazilian Journal of Infectious Disease**, v.14, n.2, p.97-106, 2010.