

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



Dissertação

***Staphylococcus* coagulase negativa potencialmente patogênicos isolados do
fluxograma de abate de suínos**

Thaís Gonçalves Gonçalves

Pelotas, 2020

Thaís Gonçalves Gonçalves

***Staphylococcus* coagulase negativa potencialmente patogênicos isolados do
fluxograma de abate de suínos**

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

G635s Gonçalves, Thaís Gonçalves

Staphylococcus coagulase negativa potencialmente patogênicos isolados do fluxograma de abate de suínos / Thaís Gonçalves Gonçalves ; 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. Suínos - Abate. 2. Biofilme. 3. Estresse subletal. 4. Meticilina. 5. Intoxicação alimentar. I. Timm, Cláudio Dias, orient. II. Título.

CDD : 636.4

Thaís Gonçalves Gonçalves

Staphylococcus coagulase negativa potencialmente patogênicos isolados do
fluxograma de abate de suínos

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: 18/02/2020

Banca examinadora:

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

Profa. Dra. Fernanda de Rezende Pinto
Doutora em Medicina Veterinária Preventiva pela Universidade Estadual Paulista

Prof. Dr. Fernando da Silva Bandeira
Doutor em Ciências pela Universidade Federal de Pelotas

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

Resumo

GONÇALVES, Thaís Gonçalves. ***Staphylococcus coagulase negativa* potencialmente patogênicos isolados do fluxograma de abate de suínos**. 2020. 46f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2020.

O objetivo do presente estudo foi caracterizar genotípica e fenotipicamente isolados de *Staphylococcus coagulase negativa* (SCN) provenientes de suínos em diferentes pontos do fluxograma de abate, verificando a presença de genes codificadores de enterotoxinas estafilocócicas clássicas, identificação da espécie *aureus* em cepas coagulase negativas, capacidade de formação de biofilme, capacidade de formação de biofilme após estresse subletal e resistência a antibióticos. Foram utilizados 50 isolados de *Staphylococcus coagulase negativa* provenientes de suínos de diferentes pontos do fluxograma de abate, sendo do reto, superfície da pele após a escaldagem, superfície interna da carcaça após a evisceração, língua, linfonodos mesentéricos, papada e superfície externa da carcaça no pré-resfriamento. No presente estudo a pesquisa dos genes *sea*, *seb*, *sec* e *sed* foi determinada pelo método PCR e a avaliação da capacidade de formação de biofilme foi estabelecida pelo método em Ágar Vermelho Congo. O perfil de resistência antimicrobiana foi realizado pela técnica de disco-difusão em Ágar Müller-Hilton. Foi detectado que 24% (12/50) dos isolados carregavam genes codificadores de toxinas e, destes, 16,6% (2/12) foram identificados como *S. aureus*. A capacidade de formação de biofilme foi detectada em 83,3% (10/12) dos SCN. A maioria dos isolados mantiveram suas características formadoras de biofilme após serem submetidas a estresse subletal. Entretanto, um isolado não formador passou a formar biofilme após estresses por calor, frio, ambiente ácido e salino, e duas cepas formadoras de biofilme não manifestaram essa característica quando expostas a ambiente salino. A concentração de 5% de NaCl foi capaz de inibir a formação de biofilme das cepas caracterizadas como produtoras. A resistência à metilicina foi observada em 75% (9/12) dos isolados e 91,6% (11/12) apresentaram resistência diante da penicilina G. *Staphylococcus coagulase negativa* presentes no fluxograma de abate podem carrear genes codificadores de SEA, SEB, SEC e SED, ser capazes de formar biofilme ou adquirir esta capacidade após exposição a estresses subletais e apresentar resistência à metilicina, constituindo um potencial perigo microbiológico para a saúde pública. Os resultados do estudo revelam a importância da pesquisa de SCN em alimentos e são um alerta em relação à necessidade de cuidados quanto à contaminação dos alimentos por SCN.

Palavras-chave: biofilme; estresse subletal; intoxicação alimentar; metilicina

Abstract

GONÇALVES, Thaís Gonçalves. **Potentially pathogenic negative coagulase *Staphylococcus* isolated from the pig slaughter flowchart**. 2020. 46f.

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

The aim of the present study was to genotypically and phenotypically characterize coagulase-negative *Staphylococcus* (SCN) isolates from different spots in the pig slaughter flowchart, verifying the presence of genes encoding classic staphylococcal enterotoxins, as well as identification of the coagulase negative strains belonging to the *aureus* species, biofilm formation capacity, biofilm formation capacity after sublethal stress and antibiotic resistance. Fifty coagulase negative *Staphylococcus* isolates from pigs from different spots of the slaughter flowchart were used. The spots were rectum, skin surface after scalding, internal surface of the carcass after evisceration, tongue, mesenteric lymph nodes, double chin and external surface of the carcass in the pre-chilling. In the present study, the analysis of the *sea*, *seb*, *sec*, *sed* and *tst* genes was determined by the PCR method and the evaluation of the biofilm formation capacity was established on Congo Red Agar. The antimicrobial resistance profile was performed by the disk-diffusion technique on Agar Müller-Hilton. It was detected that 24% (12/50) of the isolates carried genes encoding toxins and, of these, 16.6% (2/12) were identified as *S. aureus*. The capacity of biofilm formation was detected in 83.3% (10/12) of the SCN. Most isolates maintained their biofilm-forming characteristics after being subjected to sublethal stress. However, one non-forming isolate started to form biofilm after heat, cold, acidic and saline stresses, and two biofilm-forming strains did not manifest this characteristic when exposed to saline environment. The concentration of 5% NaCl was able to inhibit the biofilm formation of the strains characterized as biofilm producing. Resistance to methicillin was observed in 75% (9/12) of the isolates and 91.6% (11/12) of the isolates showed resistance to the penicillin G. Coagulase-negative *Staphylococcus* present in the slaughter flowchart can carry genes encoding SEA, SEB, SEC and SED. These strains can also be able to form biofilm or acquire this capacity after exposure to sublethal stresses and present resistance to methicillin, constituting a potential microbiological danger to public health. These results reveal the importance of SCN research in food and represent an alert regarding the need for care regarding contamination of food by SCN.

Keywords: biofilm; sublethal stress; food poisoning; methicillina

Lista de Tabelas

Tabela 1	Origem dos isolados de SCN utilizados para caracterização fenotípica e genotípica	19
Tabela 2	Número de isolados obtidos de diferentes pontos do fluxograma de abate de suínos com presença dos genes <i>sea</i> , <i>seb</i> , <i>sec</i> , <i>sed</i> e <i>tst</i>	22
Tabela 3	Formação de biofilme por SCN após serem submetidos a diferentes tipos de estresse subletal	25

Sumário

1 Introdução.....	7
2 Artigo.....	15
3 Considerações Finais.....	37
Referências.....	38

1 Introdução

Segundo a Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA, 2016) a suinocultura é uma importante atividade para a economia do Brasil, visto que a carne suína é a proteína animal mais consumida e produzida no mundo, seguido da carne de frango e bovina (USDA, 2016). Há mais de dez anos, o Brasil ocupa a quarta posição no ranking mundial de produção de carne suína, permanecendo somente atrás da China, União Europeia e Estados Unidos, e é o sexto maior consumidor dessa proteína (ANTUNES, 2018), com consumo de 14,7 kg de carne suína *per capita* (ABPA, 2018). O volume de exportação em setembro de 2019 alcançou 58 mil toneladas, número 2,6% maior em relação ao registrado no mesmo período de 2018, com 56,6 mil toneladas (ABPA, 2019), o que representa 9,0% das exportações mundiais (ABPA, 2017).

A carne suína é um alimento rico em nutrientes, por isso apresenta inúmeros benefícios para a saúde humana (DO AMARAL et al., 2011). É rica em proteínas de alto valor biológico, ácidos graxos monoinsaturados e minerais, com destaque para o cálcio, ferro, fósforo, potássio e zinco (DOS ANJOS, 2018), além de ser constituída por 75% de água, 22,8% de proteínas, 1,2% de gordura e 1,0% de minerais. Ademais, é excelente fonte de vitaminas hidrossolúveis do grupo B, como tiamina (B1), riboflavina (B2), niacina (B3), piridoxina (B6) e cobalamina (B12) (ROÇA, 2000). Logo, devido sua composição nutricional, pH próximo a 7,0 e alta umidade, a carne suína constitui um excelente meio para multiplicação de microrganismos patogênicos responsáveis por causar doenças transmitidas por alimentos (DTA), que são aquelas provocadas pela ingestão de alimentos e/ou água contaminados por microrganismos patogênicos e/ou suas toxinas (BRASIL, 2001).

De acordo com MURLIKI (2018) e BRASIL (2019) é estimado que as DTA causem, a cada ano, o adoecimento de uma a cada dez pessoas, podendo ser fatais, especialmente em crianças menores de cinco anos, idosos e imunossuprimidos (OLIVEIRA et al., 2015), gerando uma grande preocupação de saúde pública global. No Brasil, de acordo com dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação

(SINAN), são notificados, em média, 700 surtos de DTA por ano, com envolvimento de 13 mil doentes e dez óbitos (BRASIL, 2019). De 2016 a 2017, ocorreram 19.255 casos de doentes acometidos por DTA no Brasil, culminando em 19 óbitos (BRASIL, 2018).

O gênero *Staphylococcus* compreende diversas espécies e subespécies, que se encontram amplamente distribuídas na natureza. Esse gênero divide-se em dois grandes grupos com base na produção da enzima coagulase. As produtoras da enzima denominam-se *Staphylococcus* coagulase positiva (SCP), enquanto as que não produzem essa enzima são denominadas *Staphylococcus* coagulase negativa (SCN). Os *Staphylococcus* pertencem à família Staphylococcaceae (SCHLEIFER et al., 2015), são cocos, Gram-positivos, imóveis, anaeróbios facultativos, não esporulados, catalase positiva e apresentam metabolismo fermentativo com produção de ácido e não gás. Podem crescer em meios contendo 10% de cloreto de sódio (PASSOS et al., 2012; SILVA, 2015). São mesófilos, com temperatura de desenvolvimento entre 7 a 48 °C, sendo a temperatura ótima 37 °C e pH na faixa de 4,0 a 10, com pH ótimo próximo da neutralidade (FRANCO et al., 2008).

Até o momento, já foram descritas dentro do gênero 52 espécies, das quais 38 são classificadas como SCN (BECKER et al., 2014), tendo como principal fator de virulência a produção de enterotoxinas. Os SCN são bactérias de natureza ubiquitária, podendo compor a microbiota de humanos e animais, atingindo contagens de 10^3 a 10^6 UFC/cm² em algumas regiões do corpo (CUNHA, 2012). Nas indústrias alimentícias, essas bactérias ocorrem através dos manipuladores ou do próprio animal, sendo esses microrganismos, excelentes indicadores das Boas Práticas de Fabricação e Manipulação adotadas no estabelecimento (BASANISI et al., 2016). MICHELIN et al. (2006) ressaltaram que procedimentos de cozimento, fermentação, pasteurização ou defumação, são capazes de destruir esses microrganismos, portanto, sua ocorrência nos alimentos indica contaminação pós-processamento.

Embora essas bactérias sejam consideradas saprófitas, sequências de genes que codificam para enterotoxinas e outros fatores de virulência de *S. aureus*, como leucocidina, toxinas esfoliativas A e B, hemolisinas α , β , δ e γ e resistência a alguns antibióticos, já foram identificados no genoma de algumas espécies de SCN (PARK et al., 2011; PODKOWIK et al., 2012).

S. aureus tem sido considerado o principal representante do grupo SCP. Entretanto, FOX et al. (1996) reportaram o isolamento de *S. aureus* produtores de

pouca ou nenhuma coagulase, portanto, classificados como SCN e OLIVEIRA et al. (2011) identificaram cepas enterotoxigênicas de *S. aureus* coagulase negativa isoladas de leite de vaca produzido no Brasil. As enterotoxinas estafilocócicas (SE) são proteínas com peso molecular que varia de 22 a 30 KDa, de cadeia simples e globulares (WU et al., 2016), solúveis em água e solução salina (HENNEKINNE et al., 2012). Dentre as toxinas produzidas por *Staphylococcus*, destacam-se as SE, a Toxina 1 da síndrome do choque tóxico (TSST-1) e as toxinas esfoliativas (ETA a ETD) (BUKOWSKI et al., 2010; VASCONCELOS et al., 2011; FOWOYO e OGUNBANWO, 2016). As formas clássicas das enterotoxinas são enterotoxina estafilocócica A (SEA), B (SEB), C (SEC), D (SED) e E (SEE), codificadas pelos genes *sea*, *seb*, *sec*, *sed* e *see*, respectivamente (FREITAS, 2005). Até hoje, 23 diferentes SE foram identificadas, todavia, 95% dos surtos confirmados são causados pelas enterotoxinas clássicas (RAHIMI e ALLIAN, 2013; BARAN et al., 2017) que, funcionalmente são relacionadas e apresentam homologia nas sequências (LIN et al., 2010). Além da semelhança na estrutura molecular e no mecanismo de ação semelhantes, as SE são termoestáveis, podendo permanecer no alimento mesmo após tratamento térmico, como a pasteurização e cocção normal, o que aumenta sua importância na indústria e alimentos (PODKOWICK, 2013). Em seu estado ativo, as toxinas resistem à ação de enzimas proteolíticas como a pepsina, tripsina, quimiotripsina, papaína e renina, o que permite sua ação no trato gastrointestinal, possibilitando a instalação de um quadro de intoxicação (ARGUDIN et al., 2010). Assim, mesmo que a bactéria seja inativada e eliminada, a enterotoxina permanece biologicamente viável (ERTAS et al., 2010).

O gene *sea* é responsável pela síntese de 257 aminoácidos e codifica uma proteína de 27,1 kDa (BALABAN; RASSOLY 2000). A SEB é uma proteína de 31,4 KDa (DINGES et al., 2000). De acordo com base nas diferenças antigênicas, a SEC possui algumas variações, nomeadas SEC 1, 2 e 3. O gene *sec1* e *sec3* codificam proteínas de 27,4 kDa e o gene *sec2* codifica uma proteína de 26 kDa (CHEN et al., 2001; LUZ, 2008). O gene *sed* codifica uma proteína com 27,4 kDa e o plasmídeo que está localizado esse gene também carrega genes de resistência à penicilina (SOARES et al., 1997).

Os fatores necessários para produção de enterotoxina dependem da atividade de água e natureza do alimento, pH, número de células, características bacterianas e temperatura (FONTE, 2012). A quantidade de SE que é produzida nos alimentos

depende do tipo de enterotoxina que é secretada, por exemplo, na fase logarítmica da multiplicação bacteriana ocorre a síntese de SEA e SED, enquanto que a produção de SEB e SEC ocorrem no final da fase estacionária (MICUSAN e THIBODEAU, 1993).

A quantidade de enterotoxina necessária para causar a doença depende da suscetibilidade do indivíduo, quantidade de enterotoxina ingerida, faixa etária, peso corporal e saúde do hospedeiro (FERREIRA, 2014). De acordo com SILVA et al. (2017), doses inferiores a 1 µg/kg já podem causar intoxicação e quando a população da bactéria alcança valores superiores a 10⁶ UFC/g de alimento, este é considerado como passível de causar intoxicação. KITAMOTO et al. (2009) relataram que a SEC está entre as enterotoxinas mais comumente recuperadas de surtos de intoxicação alimentar em todo o mundo, entretanto, a maioria das doenças de origem alimentar ocorridas nos EUA, são causadas pela SED, sendo que há poucos relatos sobre a ocorrência da SEB.

Uma técnica útil para a identificação e investigação do potencial enterotoxigênico de cepas de *Staphylococcus* é a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). É uma técnica rápida, acurada, sensível e específica (ZSCHÖCK, 2005), no entanto, essa técnica apenas detecta a presença dos genes, não a sua expressão (HENNEKINE et al., 2012). A identificação do gene codificador de enterotoxina não é um indicador da capacidade do microrganismo de produzir a toxina em quantidades suficientes para causar doença ou a toxina estar biologicamente ativa ou de forma intacta (McLAUHLIN et al., 2000). Contudo, se a bactéria possui estes genes, é bastante provável que seja capaz de expressá-los e produzir enterotoxinas, ocasionando doenças de origem alimentar (SILVA, 2015).

A intoxicação alimentar estafilocócica é uma das doenças de origem alimentar mais comuns em todo mundo (HENNEKINNE et al., 2012). De acordo com a European Food Safety Authority (EFSA, 2017), as intoxicações são a segunda maior causa de surtos associados ao consumo de alimentos contaminados na Europa, destacando-se as toxinas estafilocócicas e toxinas produzidas por *Bacillus cereus*. A intoxicação alimentar estafilocócica ocorre devido a ingestão de enterotoxinas produzidas e liberadas pela bactéria durante sua multiplicação no alimento (HENNEKINNE et al., 2012). De acordo com WU et al. (2016) alimentos úmidos e proteicos são mais propícios a estarem contaminados por SE. Vários alimentos já foram causadores de surtos de intoxicação alimentar estafilocócica, dentre eles destaca-se a carne e seus

derivados e o leite e seus derivados (SILVA et al., 2010) e ovos (PIRES, 2011).

Em 1999, ocorreu um surto de intoxicação alimentar envolvendo SCN, após a ingestão de leite cru contaminado, em Minas Gerais, Brasil. A análise desse alimento confirmou uma elevada contagem de SCN ($2,0 \times 10^8$ UFC/mL) e detectou a produção das enterotoxinas SEC e SED (CARMO et al., 2002). Entre 2010 e 2015, ocorreram 32 surtos de intoxicação alimentar estafilocócicas notificados em diferentes municípios mineiros, associados ao consumo de bolos confeitados. Dos 32 surtos notificados, em 29 (90,6%) a contagem de *Staphylococcus* foi igual ou superior a 10^5 UFC/g e, dessas cepas, três eram SCN, sendo que duas foram identificadas como produtoras da SEB e SED (GOULART et al., 2016). Contudo, desconhece-se a verdadeira incidência de intoxicações estafilocócicas causadas por SCN, visto que a notificação da intoxicação estafilocócica não é compulsória no Brasil e em vários países, geralmente apenas grandes surtos chegando ao conhecimento das autoridades sanitárias (FRAZIER e WESHOFF, 2000).

Outro fator de virulência de algumas cepas desse gênero bacteriano é a produção de biofilme, visto que protegem as cepas tanto no ambiente, quanto no hospedeiro (O'GARA, 2001). Esse mecanismo é considerado um dos principais fatores de virulência dos SCN (CAFISO et al., 2004). O biofilme é um agregado celular monoespécie ou multiespécie, embutido em uma matriz polimérica, contendo polissacarídeo extracelular, proteínas, glicoproteínas e glicolípídeos formando uma estrutura hidratada e porosa (FLEMMING, 2007). Fixam-se em superfícies bióticas, como tecidos vegetais ou animais, ou abióticas, como por exemplo, metais e polímeros diversos (BOARI et al., 2009; ANTUNES et al., 2011; DICICCO et al., 2012).

A aderência das bactérias nas superfícies é mediada pela formação do Polissacarídeo Capsular Adesina (PS/A). Segundo ADHIKARI et al. (2007) e SHAW et al. (2007), a produção de PS/A é mediada por produtos do gene cromossomal *ica*, organizados em uma estrutura denominada *operon ica* ADBC, composta por quatro genes, *icaA*, *icaD*, *icaB* e *icaC*, além de um gene regulatório transcrito em sentido oposto, denominado *icaR*. O Polissacarídeo Intercelular Adesina (PIA) é responsável pela formação de multicamadas de células no biofilme. A expressão do PIA presente na parede celular também é responsabilidade do *operon ica* ADBC que, quando ativado, codifica quatro proteínas essenciais para a síntese do PIA (BALABAN et al., 2007). A formação do biofilme é um processo dinâmico que ocorre em cinco fases, caracterizadas como adesão, proliferação bacteriana, formação de polissacarídeo,

maturação e dispersão (OTTO, 2013; LE et al., 2014). Na fase de maturação ocorre a produção do *slime*, que é uma camada de polissacarídeo extracelular que preserva o crescimento superficial aderente (ALCARÁZ, 2003).

Uma vez aderidas, as bactérias transpassam do estado planctônico para um estado sésil e apresentam características fisiológicas diferentes formando colônias que, quando se desprendem da estrutura, retornam ao estado inicial (MONROE, 2007). Além de causarem prejuízos decorrentes da diminuição da vida útil dos equipamentos e pôr em risco a segurança microbiológica dos alimentos, os biofilmes propiciam o aumento da resistência bacteriana a sanitizantes e antimicrobianos, dificultando seu controle e eliminação (OLIVEIRA et al., 2010). Em processamentos de carnes e lácteos, os biofilmes representam mais de 90% dos contaminantes presentes em sistemas industriais (LUCCHESI, 2006).

Uma das formas de detecção da produção de biofilme é através da técnica do Ágar Vermelho Congo (*Congo Red Agar - CRA*), que foi desenvolvida por FREEMAN et al. (1989) como um método alternativo com alta sensibilidade e rapidez para determinar a produção de biofilme por cepas de SCN. Esse método avalia a produção fenotípica do biofilme (BRAVO, 2016), portanto, não é quantitativo, mas baseado em uma avaliação cromática (ARCIOLA, 2002). O método já foi comparado com outros na detecção da produção de biofilme, como técnicas de biologia molecular e métodos de quantificação de biofilme em microplacas, apresentando bons resultados (JAIN e AGARWAL, 2009). Na técnica, a sacarose é utilizada como fonte de carbono, que é o precursor da formação do *slime*. O vermelho congo é um corante que se liga ao exopolissacarídeo produzido pela bactéria. As amostras produtoras de *slime* aparecem como colônias negras e as não produtoras como colônias avermelhadas ou róseas (BERNARDI, 2007).

Outro fator de virulência apresentado por *Staphylococcus spp.* é a resistência bacteriana. O uso indiscriminado de fármacos antimicrobianos em animais e humanos, seja para fins terapêuticos, profiláticos, ou ainda, como suplementação alimentar, favorece a seleção de cepas resistentes (ANDRÉ et al., 2006), tornando-as predominantes em uma população bacteriana, com o potencial de transferir material genético para outras bactérias, que acabam por adquirir resistência (SANTOS, 2018). Segundo VAN BOECKEL et al. (2015), o Brasil possui elevada utilização de antimicrobianos na produção animal, o que constitui um sério problema do ponto de vista clínico e de saúde pública, visto que as classes de antimicrobianos utilizados na

medicina veterinária pertencem às mesmas utilizadas na medicina humana (ARIAS e CARRILHO, 2012).

Os SCN de origem alimentar podem ser capazes de transferir genes de resistência a múltiplos antimicrobianos para microrganismos susceptíveis, incluindo patogênicos (WANG et al., 2018). Já foram detectadas em alimentos cepas de SCN resistentes a antimicrobianos (MARTIN et al., 2006) e foram identificados em SCN isolados de culturas iniciadoras, bactérias probióticas e fermentadoras de carne, genes para resistência a tetraciclina, eritromicina e β -lactâmicos (SIMEONI et al., 2008). Pode ocorrer a transmissão cruzada interespecífica de linhagens resistentes (GUIMARÃES, 2011), pois ao consumir produtos de origem animal, a população pode contrair essas cepas resistentes (SOUZA et al., 2016).

A resistência à meticilina é mediada pelo gene *mecA* que codifica a proteína de ligação à penicilina PBP2a, que confere resistência à meticilina, vários antimicrobianos β -lactâmicos e também a outros grupos de antibióticos, como quinolonas e aminoglicosídeos (KONDO et al., 2007). Nos últimos anos, ocorreram alterações na epidemiologia das cepas resistentes à meticilina. KLIBI et al. (2018) identificaram resistência à meticilina em 29,41% (20/68) dos isolados de SCN provenientes de leite bovino mastítico que analisaram. Esses relatos de cepas de SCN resistentes à meticilina fortalecem a necessidade de revisar sua relevância na segurança alimentar (BHARGAVA e ZHANG, 2012; HAMMAD et al., 2012; MOURA et al., 2012).

A legislação brasileira não preconiza a pesquisa de SCN em alimentos envolvidos em surtos, sendo verificado, apenas, um limite máximo para SCP (BRASIL, 2001), colaborando para a falta de dados quanto à presença daqueles microrganismos em alimentos. A enumeração apenas de SCP em alimentos pode subestimar o grau de contaminação por *Staphylococcus* enterotoxigênicos (FERREIRA, 2018). A possibilidade da presença de *S. aureus* coagulase negativa ressalta a importância da pesquisa de SCN em alimentos (FERREIRA, 2018).

O objetivo do presente estudo foi caracterizar genotípica e fenotipicamente isolados de *Staphylococcus* coagulase negativa provenientes de diferentes pontos do fluxograma de abate de suínos, pesquisando a presença de genes codificadores de enterotoxinas estafilocócicas clássicas e TSST-1, identificando a espécie *aureus* em cepas coagulase negativas, testando a capacidade de formação de biofilme após exposição a estresses subletais e verificando a resistência a antibióticos.

2 Artigo

***Staphylococcus* coagulase negativa potencialmente patogênicos isolados do fluxograma de abate de suínos**

Thaís Gonçalves Gonçalves, Débora Rodrigues Silveira, Kauana Kaefer, Lauren Machado Moreira, Cláudio Dias Timm

Foi submetido à revista Brazilian Archives of Biology and Technology

***Staphylococcus* coagulase negativa potencialmente patogênicos isolados do fluxograma de abate de suínos**

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi caracterizar genotípica e fenotipicamente isolados de *Staphylococcus* coagulase negativa (SCN) provenientes de diferentes pontos do fluxograma de abate de suínos, sendo reto, superfície da pele após depiladeira, superfície interna da carcaça após evisceração, língua, linfonodos mesentéricos, papada e superfície externa da carcaça no pré-resfriamento, verificando a presença de genes codificadores de enterotoxinas estafilocócicas clássicas, identificação da espécie *aureus* em cepas coagulase negativas, capacidade de formação de biofilme, capacidade de formação de biofilme após estresse subletal e resistência a antibióticos. Foram utilizadas 50 isolados de *Staphylococcus* coagulase negativa provenientes de suínos em diferentes pontos do fluxograma de abate. Foi detectado que 24% (12/50) dos isolados carregavam genes codificadores de toxinas e, destes, 16,6% (2/12) foram identificados como *S. aureus*. A capacidade de formação de biofilme foi detectada em 83,3% (10/12) dos SCN. Em relação a capacidade de formação de biofilme após estresse subletal, a maioria das cepas mantiveram suas características formadoras de biofilme. Entretanto, três isolados não formadores passaram a formar biofilme após estresses por calor, frio, ambiente ácido e salino, e duas cepas formadoras de biofilme não manifestaram essa característica quando expostas a ambiente salino. A resistência à metilina foi observada em 75% (9/12) dos isolados. SCN presentes no fluxograma de abate podem carrear genes codificadores de SEA, SEB, SEC e SED, ser capazes de formar biofilme ou adquirir esta capacidade após exposição a estresses subletais e apresentar resistência à metilina, constituindo um potencial perigo microbiológico para a saúde pública. Os resultados do estudo são um alerta em relação à necessidade de cuidados quanto à contaminação dos alimentos por SCN.

INTRODUÇÃO

O Brasil ocupa o quarto lugar no ranking mundial em produção de carne suína e as exportações brasileiras dessa proteína representam 9% das exportações mundiais (ABPA, 2018), sendo a suinocultura considerada uma atividade reconhecida e importante para a economia brasileira (ABPA, 2016). A carne suína é constituída por 75% de água e é um alimento rico em nutrientes, como proteínas de alto valor biológico, minerais, ácidos graxos monoinsaturados e vitaminas hidrossolúveis do complexo B. Devido a essas características, pode tornar-se um veiculador de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA), que decorrem da ingestão de água ou alimentos contaminados por microrganismos patogênicos e/ou suas toxinas (Brasil, 2001).

Os *Staphylococcus* coagulase negativa são um grupo do gênero *Staphylococcus* que possui a característica de não produzir a enzima coagulase (Brasil, 2001). São descritas 52 espécies de *Staphylococcus*, sendo 38 pertencentes ao grupo SCN (Becker et al., 2014). São bactérias ubiqüitárias e saprófitas da microbiota natural de humanos e animais, que são importantes veículos de contaminação desse microrganismo dentro das indústrias alimentícias (Basanisi et al., 2016).

Fatores de virulência como leucocidina, toxinas esfoliativas A e B, enterotoxinas, hemolisinas α , β , δ e γ e fatores de resistência a antimicrobianos já foram apontados no genoma de algumas espécies de SCN (Park et al., 2011; Podkowik et al., 2012). As enterotoxinas estafilocócicas (SE) são um importante fator de virulência dos *Staphylococcus*. São proteínas de baixo peso molecular, solúveis em água, termoestáveis, resistentes ao ácido gástrico e possuem a característica de agirem como superantígenos que induzem uma exacerbada proliferação de células T (Xu & MC cormick, 2012). Até o momento, 23 diferentes SE foram detectadas, entretanto, as enterotoxinas clássicas (SEA, SEB, SEC, SED e SEE) são as mais frequentemente implicadas em surtos de intoxicação alimentar estafilocócica (Rahimi & Allian, 2013; Baran et al., 2017) e, dentre estas, SEC e SED são as mais comuns (Carmo et al., 2002; Kitamoto et al.,

2009). A quantidade de enterotoxina necessária para causar a doença depende da suscetibilidade do hospedeiro, faixa etária e peso corporal (Ferreira, 2014). A presença dos genes que codificam para a síntese das SE no genoma bacteriano é uma forte indicação do potencial de produção das toxinas (Silva, 2015).

De acordo com Leite (2013), a capacidade de formar biofilme é um importante fator de virulência dos *Staphylococcus*, incluindo os SCN (Cafiso et al., 2004). O biofilme bacteriano é caracterizado como um agregado celular sésil, monoespécie ou multiespécie embutido em uma matriz de exopolissacarídeos, proteínas, glicoproteínas e glicolipídeos (Flemming et al., 2007) fixada em superfícies bióticas ou abióticas (Dicicco et al., 2012). Os biofilmes representam fonte de contaminação contínua para os alimentos, pois dificultam a eliminação das bactérias das superfícies de equipamentos e utensílios nas indústrias alimentícias (Abdallah et al., 2014; Oliveira et al., 2010).

A resistência à meticilina confere para as cepas resistência a quase todos os β -lactâmicos e a outros grupos de antimicrobianos, como aminoglicosídeos e quinolonas (Kondo et al., 2007). O perigo para a saúde pública representado pela presença em alimentos de cepas de SCN resistentes a antimicrobianos, particularmente à meticilina, é potencializado, uma vez que a eliminação desses agentes por antimicrobianos é mais difícil.

O objetivo do estudo foi caracterizar genotipicamente e fenotipicamente isolados de *Staphylococcus* coagulase negativa provenientes de diferentes pontos do fluxograma de abate de suínos, pesquisando a presença de genes codificadores de enterotoxinas estafilocócicas clássicas e TSST-1, identificando a espécie *aureus* em cepas coagulase negativas, testando a capacidade de formação de biofilme após situações de estresses subletais e verificando a resistência a antibióticos.

MATERIAL E MÉTODO

Origem dos isolados

Foram utilizados 50 isolados de SCN previamente obtidos de diferentes pontos do fluxograma de abate de suínos estocados em BHI (Himedia, Mumbai, India) com glicerol a 20 % e mantidos a 4 °C no banco de cepas do Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal (LIPOA) da Universidade Federal de Pelotas, UFPel (Tabela I).

Tabela I – Origem dos isolados de SCN utilizados para caracterização fenotípica e genotípica

Fonte	Nº isolados
Reto	5
Superfície da pele após a escaldagem	6
Superfície interna na carcaça após a evisceração	5
Língua	10
Linfonodo	4
Papada	10
Superfície externa da carcaça no pré-resfriamento	10

Pesquisa de genes que codificam para toxinas

O DNA dos isolados foi extraído conforme protocolo descrito por Sambrook & Russel (2001) e posteriormente foi realizada a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para detecção dos genes que codificam para as toxinas SEA e SEC utilizando *primers* específicos conforme protocolo descrito por Cunha et al. (2006), com modificações. Cada 25 uL da reação continha 1,0 uL de cada *primer*; 2,5 uL de DNA; 8,0 uL de água e 12,5 uL de master mix (Promega, Madison, Estados Unidos). A amplificação foi executada em termociclador utilizando um primeiro ciclo a 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 72 °C por 1 min e 30 s. Após, 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 para 51 °C por 1 min e 30 s, seguida de 37 ciclos de desnaturação a 94 °C por 2 min, anelamento a 47,6 °C por 1 min e 30 s, para a enterotoxina SEC, e 42,5 °C por 1 min e 30 s, para a enterotoxina SEA, e extensão a 72 °C por 1 min e 30 s, seguido de um ciclo final a 72 °C por 7 min. As pesquisas dos genes codificadores da enterotoxina estafilocócica B e D nos isolados foi realizada conforme descrito por Andretta (2019). Como controle positivo, foi utilizado DNA de quatro cepas de *S. aureus* confirmadas como portadoras dos genes de interesse e, como controle negativo, o DNA bacteriano foi substituído por água. Os produtos da PCR foram corados com Diamond Nucleic Acid Dye (Promega, Madison, Estados Unidos) para visualização em eletroforese em gel de agarose (Panreac Química SA, Barcelona, Espanha) a 1%.

PCR para detecção da espécie *S. aureus*

A identificação da espécie *S. aureus* foi feita através da análise do DNA dos isolados confirmados como toxigênicos, pesquisando a presença do gene *nuc* com o uso de *primers* específicos, conforme o protocolo descrito por Sasaki et al. (2010). Os produtos da PCR foram visualizados conforme descrito anteriormente.

Formação de biofilme em Vermelho Congo

A produção de biofilme pelas cepas de SCN foi determinada pelo cultivo em Ágar Vermelho Congo (CRA, *Red Congo Agar*, Êxodo Científica, Brasil), utilizando 0,8 g de corante Vermelho Congo para 1 litro de Ágar Infusão de Cérebro e Coração (BHA, *Brain Heart Infusion Agar*, Kasvi, Brasil) e 50 g de sacarose (Labsynth, Brasil) (Freeman et al., 1989). Os inóculos foram semeados em CRA por esgotamento e incubados a 37 °C por 24 h e, após, a 25 °C por 24 h (Mariana et al., 2009). A produção de colônias rugosas e pretas foi utilizada para diferenciar de

cepas não produtoras de biofilme, as quais apresentam colônias lisas e avermelhadas. Foram utilizadas quatro cepas de *S. aureus* isoladas de carne suína, previamente testadas quanto à formação de biofilme por Silva (2019), duas definidas forte formadoras de biofilme, para controle positivo, e duas não produtoras de biofilme, como controle negativo.

Formação de biofilme após estresse subletal

Após a classificação quanto a capacidade de formar biofilme, os isolados foram utilizados para avaliar o efeito de estresses subletais sobre a formação de biofilme. Para exposição das células ao choque de calor, culturas *overnight* em Caldo Infusão Cérebro e Coração (BHI, *Brain and Heart Infusion Broth*, Himedia, Índia) 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). Os procedimentos descritos por Wong et al. (1998) foram utilizados para estressar as células bacterianas em ambiente ácido. Culturas *overnight* em BHI tiveram o pH ajustado para 5,0 com HCl 6M e foram incubadas a 37 °C durante 30 min. As células também foram estressadas em ambiente salino, utilizando culturas *overnight* em BHI que foram submetidas a concentrações de 2,5% e 5% de NaCl em CRA.

Após a indução do estresse subletal, os isolados foram testados quanto à capacidade de formação de biofilme em placas de CRA, seguindo a técnica já descrita anteriormente.

Sensibilidade a antimicrobianos

Para avaliação da sensibilidade a antimicrobianos foi realizado o teste de disco-difusão (Bauer et al., 1966), utilizando-se os antimicrobianos: ampicilina (30 mcg) (Laborclin, Brasil), cefalotina (30 mcg) (Laborclin), cefoxitina (30 mcg) (Laborclin), enrofloxacina (5 mcg) (Cefar, Brasil), neomicina (30 mcg) (DME, Brasil), penicilina G (10U) (Laborclin), sulfonamida (300 mcg) (Laborclin) e trimetropim (5 mcg) (CECON, Brasil). Após a incubação os halos

inibitórios foram medidos com régua graduada e os resultados expressos em milímetros, conforme recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2015).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observou-se que 24% (12/50) dos isolados estudados carregavam, pelo menos, um gene codificador de toxina. A superfície da carcaça antes da entrada para a câmara fria continha o maior número de isolados toxigênicos, seguido da papada, reto, língua e superfície interna da carcaça após a evisceração (Tabela II).

Tabela II- Número de isolados obtidos de diferentes pontos do fluxograma de abate de suínos com presença dos genes *sea*, *seb*, *sec* e *sed*

Origem dos isolados	<i>sea</i>	<i>seb</i>	<i>sec</i>	<i>sed</i>	<i>sea+ seb</i>	<i>sea+ sec</i>	Total (%)^b
Reto	-	-	-	1	-	1	2(28,5)
Superfície da pele após escaldagem	-	-	-	-	-	-	-
Superfície interna da carcaça após evisceração	1	-	-	1	-	-	2(28,5)
Língua	-	-	-	2	-	-	2(28,5)
Linfonodos	-	-	-	-	-	-	-
Papada	-	-	-	2	-	1	3(42,8)
Superfície externa da carcaça no pré-resfriamento	-	1	4	4	1	1	11(157,1)
Total (%)^a	1(8,3)	1(8,3)	4(33,3)	10(83,3)	1(8,3)	3(25)	20

^a Percentual do total de SCN que possuíam o(s) gene(s); ^b percentual de amostras analisadas no ponto do fluxograma que estavam contaminadas com SCN portadores de gene(s) toxigênicos(s).

Resultados semelhantes ao nosso foram demonstrados por Vieira (2017) que detectou genes codificadores de toxina em 23% (48/205) de SCN isolados de queijo colonial. Já Moura et al. (2012) descreveram percentuais mais elevados aos nossos, 67,5% (27/40) dos isolados de SCN de amostras de pudim no Rio Grande do Sul possuíam um ou mais genes codificadores de toxina. Nos dois trabalhos citados, os genes mais detectados foram *sea*, *seb* e *sed*. Em nosso estudo, os genes *sec* e *sed* foram os mais frequentes. Silva (2015) também encontrou um percentual elevado do gene *sec* (26,8%) em SCN isolados de manipuladores de um restaurante universitário e Carmo et al. (2002), ao analisarem leite cru contaminado com SCN proveniente de um surto de intoxicação alimentar que acometeu 328 indivíduos em Minas Gerais, relataram a detecção da produção de SEC e SED. O gene *sec* é o segundo mais isolado de alimentos (Cunha et al., 2006; Silva, 2015). No entanto, o gene *sea* tem sido o mais isolado de diferentes tipos de alimentos no Brasil, o que pode se dever ao fato de a SEA ser tóxica em baixas concentrações, sendo conseqüentemente a mais encontrada em surtos de intoxicação alimentar estafilocócica (Balaban & Rasooly, 2000). Em nosso estudo, foi constatado que quatro isolados carregavam mais de um gene codificador de enterotoxina, sendo *sea* o mais prevalente.

A ocorrência de SCN toxigênicos na carcaça no último ponto do fluxograma de abate reveste-se de importância por não haver nenhuma medida subsequente para eliminação desses microrganismos antes do produto ser liberado para o comércio. Nas indústrias alimentícias, manipuladores portadores podem ser importantes fontes de contaminação bacteriana para os alimentos, assim como o ambiente e os equipamentos contaminados (Gustafson et al., 2015; Podpecan et al., 2007). Logo, é indispensável a adoção de boas práticas de higiene e sanidade nas indústrias alimentícias, tanto para as superfícies de contato quanto para os manipuladores.

Dos SCN toxigênicos detectados em nosso estudo, 16,6% (2/12) eram da espécie *S. aureus*. Uma frequência maior foi identificada por Ferreira et al. (2018), que isolou 58 cepas de *S. aureus* provenientes das mãos de manipuladores, superfície da calha, superfície das carcaças e superfície das facas e chairas em um fluxograma de abate de frango e, destas, 29,3% (17/58) foram caracterizadas fenotipicamente como coagulase negativas. Em nosso estudo, as duas cepas de *S. aureus* coagulase negativa possuíam genes de toxinas. Uma cepa possuía os genes *sea* e *sec*, e a outra os genes *sea* e *sed*. Da mesma forma, Ferreira et al. (2018) também detectaram genes enterotoxigênicos em *S. aureus* isolados de manipuladores, porém apenas 2,67% (1/44), sendo o gene *sec* o único encontrado em um isolado caracterizado como *S. aureus* coagulase negativa. Ainda é pouco conhecida a frequência de *S. aureus* coagulase negativa em indústrias alimentares, pois a maioria dos trabalhos informa a ocorrência em mastite (Akineden et al., 2011; Sundareshan et al., 2012), havendo poucos estudos em carnes e embutidos. Além da carência de estudos, *S. aureus* que não produzem coagulase geralmente não são detectados em análises de rotina dos alimentos, as quais costumam estar restritas à contagem de SCP. Portanto, considerando a frequência de *S. aureus* coagulase negativa potencialmente toxigênicos observada no nosso estudo, é importante que as análises microbiológicas de rotina dos alimentos contemplem, também SCN, visto que, contagens apenas de SCP pode subestimar o grau de contaminação do alimento por cepas patogênicas.

Em relação a formação de biofilme em CRA, 83,3% (10/12) dos isolados que possuíam genes codificadores de toxinas formaram colônias negras, caracterizando a produção do biofilme. Resultados distintos foram observados em outros produtos cárneos. Osman et al. (2017) analisaram carne bovina importada no Egito e encontraram 36,6% (4/11) de SCN produtores de biofilme. Por outro lado, Wang et al. (2018) analisaram 180 cepas de SCN isoladas de carne

de frango e nenhuma apresentou capacidade de formar biofilme. Das cepas potencialmente toxigênicas formadoras de biofilme, 5/6 foram isoladas da superfície da carcaça no pré-resfriamento, 2/2 da superfície da papada, 1/2 da língua, 1/1 da superfície interna da carcaça após a evisceração e 1/1 do reto. A presença de SCN potencialmente toxigênicos formadores de biofilme na indústria de processamento de alimentos, especialmente na superfície das carcaças, constitui um risco para a segurança alimentar.

Os resultados da formação de biofilme após os isolados serem submetidos ao estresse subletal são mostrados na Tabela III.

Tabela III – Formação de biofilme por SCN potencialmente toxigênicos após serem submetidos a diferentes tipos de estresse subletal

Isolado	Calor	Frio	Ácido	NaCl (2,5%)	NaCl (5%)
Formadores de biofilme					
1	+	+	+	+	-
2	+	+	+	+	-
3	+	+	+	+	-
4	+	+	-	+	-
5	+	+	+	+	-
6	+	+	+	-	-
7	+	+	+	-	-
8	+	+	+	+	-
9	+	+	+	+	-
10	+	+	+	+	-
Não formadores de biofilme					
11	-	-	-	+	-
12	+	+	+	+	-

(+) Formação de biofilme; (-) não formação de biofilme.

Após os estresses por calor, frio, ambiente ácido e salino a 2,5%, o isolado fenotipicamente não formador de biofilme passou a desenvolver essa capacidade. Isso pode ter ocorrido porque as células bacterianas desenvolvem respostas adaptativas ao estresse para sobreviverem em ambientes hostis (Ron, 2006). A característica observada, de SCN não formadores de biofilme passarem a formá-lo sob baixas temperaturas, é particularmente importante, considerando que a refrigeração é a principal forma de conservação da carne suína, tanto nos estabelecimentos alimentícios quanto nos domicílios dos consumidores.

Após estresse por calor, frio e ambiente ácido, os isolados formadores de biofilme mantiveram esta capacidade, a apenas dois isolados deixaram de formar biofilme em ambiente salino a 2,5%. Rossato et al. (2017) relataram que a presença de 0,9% de NaCl apresenta efeito inibitório na formação de biofilme por cepas de SCN isoladas de alimentos, o que não foi comprovado pelo nosso estudo, onde a concentração de 2,5%, portanto mais elevada, não foi suficiente para inibir a formação de biofilme pela maioria dos isolados. Embora não tenha inibido a multiplicação bacteriana, o ambiente salino a 5% impediu a produção de biofilme independentemente dos isolados expressarem ou não esta capacidade em ambientes mais favoráveis. Alguns produtos suínos apresentam altas concentrações de NaCl, como costela salgada, bacon, tocinho salgado, o que seria um fator inibitório para a formação de biofilme por SCN que possam contaminar estes alimentos. Entretanto, na maioria das situações, os estresses subletais aos quais os alimentos são submetidos no processamento ou armazenamento desencadeiam a capacidade dos SCN formarem biofilme e não o contrário.

Nos antibiogramas, observou-se 11 (91,6%) isolados resistentes aos antibióticos penicilina G e ampicilina. Também apresentaram resistência para cefalotina e neomicina 10 (83,3%) isolados.

Seguido de cefoxitina com 9 (75%) isolados resistentes e trimetoprim com sete (58,3%). Quatro (33,3%) isolados apresentaram resistência aos antibióticos enrofloxacino e sulfonamida.

Resultados semelhantes foram observados por Momoh et al. (2016), que detectaram cepas de SCN isoladas de suínos e carne suína, na Nigéria, apresentando alta resistência à penicilina e ao trimetoprim. Estas resistências podem ser explicadas em decorrência desses antimicrobianos serem muito utilizados na medicina humana e veterinária para tratamentos de doenças bacterianas. O uso rotineiro e em subdoses de moléculas antimicrobianas em animais destinados a alimentação pode induzir ao surgimento de bactérias multirresistentes (Nadimpalli et al., 2015; Thanner et al., 2016). Todos os isolados eram resistentes a, pelo menos, cinco antimicrobianos diferentes, corroborando os resultados encontrados por Simeoni et al. (2008), que observaram multirresistência em cepas de SCN isoladas de carne e produtos cárneos fermentados, e Rebecchi et al. (2015), que observaram cepas de SCN resistentes a diferentes classes de antimicrobianos isoladas de salame piacentino e das etapas ao longo do processo de fabricação.

Neste estudo, foi identificado que 75% (9/12) dos isolados de SCN potencialmente toxigênicos são resistentes a meticilina. Klibi et al. (2018) também observaram 29,41% (20/68) de SCN resistentes à meticilina, porém isolados de leite mastítico. O nosso trabalho é o primeiro relato de SCN resistentes à meticilina isolados de carne suína. Observou-se que 77,7% (7/9) dos isolados de SCN resistentes à meticilina eram formadoras de biofilme. Uma frequência maior foi relatada na Tailândia por Seng et al. (2017), que observaram que 90,8% das cepas de SCN resistentes à meticilina isoladas de ambientes comunitários e hospitalares eram formadoras de biofilme. O biofilme permite trocas genéticas entre as cepas e já foi demonstrada a capacidade de espécies de SCN resistentes a meticilina transportarem esse gene para *S. aureus* (Bhargava

& Zhang, 2017; Chajęcka-Wierzchowska et al., 2015). Portanto, além do risco representado pela presença de SCN potencialmente toxigênicos formadores de biofilme e resistentes à metilina em carne suína, a possibilidade de transmissão dessa resistência a outros *Staphylococcus* patogênicos também deve ser considerada.

CONCLUSÃO

SCN isolados de diferentes pontos do fluxograma de abate de suínos podem carrear genes codificadores de SEA, SEB, SEC e SED, sendo os genes *sec* e *sed* os mais frequentes. Estes SCN potencialmente toxigênicos podem formar biofilme, capacidade que pode também ser adquirida após exposição a estresses subletais, como calor, frio, ambientes ácido e salino. Adicionalmente, SCN metilina resistentes predominam entre os isolados potencialmente toxigênicos. Este foi o primeiro relato de SCN potencialmente toxigênicos, produtores de biofilme e resistentes à metilina isolados de diferentes pontos do fluxograma de abate de suínos. Os resultados obtidos mostram que a presença de SCN em suínos constitui um potencial perigo microbiológico para a saúde pública, servindo como alerta em relação à necessidade de cuidados quanto à contaminação dos alimentos por SCN.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdallah, M., Benoliel, C., Drider, D., Dhulster, P., Chihib, N. E. (2014). Biofilm formation and persistence on abiotic surfaces in the context of food and medical environments. *Archives of microbiology*, 196(7), 453-472.
- ABPA. Associação Brasileira de Proteína Animal. *Relatório Anual 2016*. http://abpa-br.com.br/storage/files/versao_final_para_envio_digital_1925a_final_abpa_relatorio_anual_2016_portugues_web1.pdf
- ABPA - Associação Brasileira de Proteína Animal. *Relatório Anual 2018*. <http://abpa-br.com.br/storage/files/relatorio-anual-2018.pdf>.
- Akineden, Ö., Hassan, A. A., Schneider, E., Usleber, E. (2011). A coagulase-negative variant of *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis milk. *Journal of dairy research*, 78(1), 38-42.
- 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.
- Balaban, N., Rasooly, A. (2000). Staphylococcal enterotoxins (review). *Journal Food Microbiology*, 61, 1-10.
- Baran, A. B., Erdoğan, A., Turgut, T., Adigüzel, M. C. (2017). A review on the presence of *Staphylococcus aureus* in cheese. *Journal of Nature and Science*, 6(2), 100-105.
- Bhargava, K., Zhang, Y. (2014). Characterization of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci (MRCoNS) in retail meat. *Food microbiology*, 42, 56-60.

Basanisi, M. G., Nobili, G., LA Bella, G., Russo, R., Spano, G., Normanno, G., LA Salandra, G. (2016). Molecular characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from sheep and goat cheeses in southern Italy. *Small Ruminant Research*, 135, 17–19.

Bauer, A. W., Kirby, W. M. M., Sherris, J. C., Turck, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*, 45, 493-496.

Becker, K., Heilmann, C., Peters, G. (2014). Coagulase negative staphylococci. *Clinical Microbiology Reviews*, 27(4), 870-926.

Borges, M. F., Nassu, R. T., Pereira, J. L., Andrade, A. P. C., Kuaye, A. Y. (2008). Perfil de contaminação por *Staphylococcus* e suas enterotoxinas e monitorização das condições de higiene em uma linha de produção de queijo de Coalho. *Ciência Rural*, 38(5), 1431-1438.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária. *Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001*. Aprova regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos. Brasília, DF.

<http://portal.anvisa.gov.br/legislacao#/visualizar/26655>.

Cafiso, V., Bertuccio, T., Santagati, M., Campanile, F., Amicosante, G., Perilli, M. G., Selan, L., Artini, M., Nicoletti, G., Stefani, S. (2004). Presence of the ica operon in clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis* and its role in biofilm production. *Clinical Microbiology Infection*, 10, 1081-88.

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. (2002). Food poisoning due to enterotoxigenic strains of

Staphylococcus present in Minas cheese and raw milk in Brazil. *Food Microbiology*, 19(1), 9-14.

Chang, C. M., Chiang, M. L., Chou, C. C. (2004). Responses of heat-shocked *Vibrio parahaemolyticus* to subsequent physical and chemical stresses. *Journal of Food Protection*, 67(10), 2183-2188.

Chajęcka-Wierzchowska W., Zadernowska A., Nalepa B., Sierpińska M., Łaniewska-Trokenheim Ł. (2015). Coagulase-negative staphylococci (CoNS) isolated from ready-to-eat food of animal origin—phenotypic and genotypic antibiotic resistance. *Food Microbiology*, 46(6), 222.

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

Cunha, M. D. L. R. D., Peresi, E., Calsolari, R. A. O., Araújo Júnior, J. P. (2006). Detection of enterotoxins genes in coagulase-negative staphylococci isolated from foods. *Brazilian Journal of Microbiology*, 37(1), 70-74.

Dicicco, M., Neethiraan, S., Singh, A., Weese, J. S. (2012). Efficacy of clarithromycin on biofilm formation of methicillin resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. *BMC Veterinary Research*, 8(1), 225-231.

Ferreira, J. M. C. N. (2014). *Genes enterotoxigênicos e resistência a antibióticos em isolados de Staphylococcus coagulase positiva de origem alimentar* (Dissertação de mestrado).

Instituto Politécnico de Castelo Branco, Castelo Branco, Portugal.

- Ferreira, A. A., Mendonça, R. C. S., de Souza Tette, P. A., de Souza Soares, A., Carvalho, M. M. (2018). Identificação fenotípica e genotípica de cepas de estafilococos oriundas de uma unidade de abate de aves. *Multi-Science Journal*, 1(2), 50-58.
- Flemming, H.C.; Neu, T.R.; Wozniak, D.J. (2007). The EPS Matrix: The house of biofilm cells. *Journal of Bacteriology*, 189, 7945-7947.
- Freeman, D. J., Falkiner, F. R., Keane, C.T. (1989). New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *Journal of Clinical Pathology*, 42, 872-874.
- Gustafson, J. E., Muthaiyan, A., Dupre, J. M., Ricke, S. C. *Staphylococcus aureus* and understanding the factors that impact enterotoxin production in foods: A review. *Food Control*, 1, 14, 2015.
- Kitamoto, M., Kito, K., Niimi, Y., Shoda, S., Takamura, A., Hiramatsu, T., Akashi, T., Yokoi, Y., Hirano, H., Hosokawa, M., Yamamoto, A., Agata, N., Hamajima, N. (2009). Food poisoning by *Staphylococcus aureus* at a university festival. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 62, 242 – 243.
- Klibi, A., Maaroufi, A., Torres, C., Jouini, A. (2018). Detection and characterization of methicillin-resistant and susceptible coagulase-negative staphylococci in milk from cows with clinical mastitis in Tunisia. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 52(6), 930-935.
- Kondo, Y., Ito, T., Ma, X. X., Watanabe, S., Kreiswirth, B. N., Etienne, J., Hiramatsu, K. (2007). Combination of multiplex PCRs for staphylococcal cassette chromosome mec type assignment: Rapid identification system for mec, ccr, and major differences in junkyard regions. *Antimicrobial Agents Chemother*, 51, 264–274.

- Leite, B. A. (2013). *Estudo da susceptibilidade e resposta dos biofilmes de estafilococos aos agentes antimicrobianos* (Dissertação de doutorado). Universidade Federal de São Carlos, São Paulo.
- Mariana, N. S., Salman, S. A., Neela, V., Zamberi, S. (2009). Evaluation of modified Congo red agar for detection of biofilm produced by clinical isolates of methicillin resistance *Staphylococcus aureus*. *African Journal of Microbiology Research*, 3(6), 330-338.
- Momoh, A. H., Kwaga, J. K. P., Bello, M., Sackey, A. K.B. (2016). Prevalence and antimicrobial resistance pattern of coagulase negative Staphylococci isolated from pigs and in-contact humans in Jos Metropolis, Nigeria. *Nigerian Veterinary Journal*, 37, 140–147.
- Moura, T. M. D., Campos, F. S., d'Azevedo, P. A., Van Der Sand, S. T., Franco, A. C., Frazzon, J., & Frazzon, A. P. G. (2012). Prevalence of enterotoxin-encoding genes and antimicrobial resistance in coagulase-negative and coagulase-positive *Staphylococcus* isolates from black pudding. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 45(5), 579-585.
- Nadimpalli, M., Rinsky, J. L., Asa, S., Salão, D., Stewart, J., Larsen, J., Nachman, K. E., Amor, D. C., Pierce, E., Pisanic, N., Strelitz, J., Harduar-Morano, L., Heaney, C. D. (2015). Persistência de *Staphylococcus aureus* resistente a antibióticos associado a animais entre trabalhadores de operação industrial de suínos na Carolina do Norte por 14 dias. *Occupational and Environmental Medicine*, 72, 90 – 99.
- Oliveira, M. M. M., Brugnera, D. F., Piccoli, R. H. (2010). Biofilmes microbianos na indústria de alimentos: uma revisão. *Revista Instituto Adolfo Lutz*, 69(3), 277-84.
- Osman, K., Alvarez-Ordóñez, A., Ruiz, L., Badr, J., ElHofy, F., Al-Maary, K. S. e Elhadidy, M. (2017). Antimicrobial resistance and virulence characterization of *Staphylococcus aureus*

and coagulase-negative staphylococci from imported beef meat. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*, 16(1), 35.

Park, J. Y., Fox, L. K., Seo, K. S., McGuire, M. A., Park, Y. H., Rurangirwa, F. R., Sicho, W. M., Bohach, G. A. (2011). Detection of classical and newly described staphylococcal superantigen genes in coagulase-negative staphylococci isolated from bovine intramammary infections. *Veterinary Microbiology*, 147(1-2), 149–154.

Podkowik, M., Bystróż, J., Bania, J. (2012). Genotypes, antibiotic resistance, and virulence factors of staphylococci from ready-to-eat food. *Foodborne Pathogens and Disease*, 9(1), 91–93.

Podpecan, B., Pengov, A., Vadnjal, S. (2007). The source of contamination of ground meat for production of meat products with bacteria *Staphylococcus aureus*. *Slovenian Veterinary Research*, 44(2), 24-30.

Rahimi, E.; Alian, F. (2013). Presence of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in cow, 12 camel, sheep, goat, and buffalo bulk tank milk. *Veterinarski Arhiv*, 83(1), 23– 30.

Rebecchi, A., Pisacane, V., Callegari, M. L., Puglisi, E., Morelli, L. (2015). Ecology of antibiotic resistant coagulase-negative staphylococci isolated from the production chain of a typical Italian salami. *Food Control*, 53, 14–22.

Ron, E. Z. (2006) *Bacterial stress response*. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K-H, Stackebrandt E (eds) *The prokaryotes*. Springer, New York, 1012–1027.

Rossatto, F. C., Pinto, J. B., Costa, G. A., & Frazzon, A. P. (2017). In vitro biofilm formation ability of staphylococci under different growth conditions. *International Journal of Applied Microbiology and Biotechnology Research*, 5(2), 12-9.

Sambrook, J.; Russel, D.W. (2001). *Molecular Cloning: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sasaki, T., Tsubakishita, S., Tanaka, Y., Sakusabe, A., Ohtsuka, M., Hirota, S., Kawakami, T., Fukata, T. & Hiramatsu, K. (2010). Multiplex-PCR method for species identification of coagulase-positive Staphylococci. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(3), 765–769.

Seng, R., Kittit, T., Thummeepak, R., Kongthai, P., Leungtongkam, U., Wannalardsakun, S., & Sitthisak, S. (2017). Biofilm formation of methicillin-resistant coagulase negative staphylococci (MR-CoNS) isolated from community and hospital environments. *PloS one*, 12(8), 0184172.

Silva, S.S.P. (2015). *Genes para enterotoxinas em Staphylococcus sp. isolados de manipuladores de alimentos de um restaurante universitário na cidade do Natal – RN* (Dissertação de mestrado). Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal.

Silva, J. R. (2019). *Caracterização fenotípica de Staphylococcus aureus isolados de alimentos de origem animal e de outras fontes relacionadas* (Dissertação de mestrado). Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Simeoni, D., Rizzoti, L., Cocconcelli, O., Gazzola, S., Dellaglio, F., Torriani, S. (2008). Genes de resistência a antibióticos e identificação de estafilococos coletados da cadeia de produtos suínos. *Microbiologia de Alimentos*, 25, 196 -201.

Sundareshan, S., Hari Babu, Y., Isloor, S., Awati, B., Hegde, N.R. (2012). Isolation and phenotype-based speciation of coagulase-negative staphylococci (CoNS) isolated from bovine milk samples. *Front Journal of Animal Science*, 1, 34–39

Thanner, S., Drissner, D., Walsh, F. (2016). Resistência antimicrobiana na agricultura.

MBiO, 7, 02227 - 02.215.

Vieira, T. R. (2017). *Pesquisa de Staphylococcus spp. Coagulase negativa em queijo colonial inspecionado: identificação, perfil de genes de enterotoxinas clássicas e de resistência à penicilina e à meticilina* (mestrado em ciências veterinárias). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

Wang, H., Wang, H., Bai, Y., Xu, X., & Zhou, G. (2018). Pathogenicity and antibiotic resistance of coagulase-negative staphylococci isolated from retailing chicken meat. *Food and Science Technology*, 90, 152–156

Wong, H. C., Peng, P. Y., Han, J. M., Chang, C. Y., Lan, S.L. (1998). Effect of mild acid treatment on the survival, enteropathogenicity, and protein production in *Vibrio parahaemolyticus*. *Infection Immunology*, 66(7), 3066-3071.

Xu, S.X.; McCormick, J.K. (2012). *Staphylococcal superantigens in colonization and disease*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2.

3 Considerações Finais

SCN potencialmente enterotoxigênicos isolados de carcaça suína podem formar biofilme, inclusive sob condições de estresse subletal, facilitando a permanência desses microrganismos dentro das indústrias alimentícias. Este é o primeiro trabalho relatando a presença de SCN potencialmente toxigênicos no fluxograma de abate de suínos, bem como sua capacidade de formação de biofilme, inclusive após serem expostas a estresse subletal, como calor, frio, ambiente ácido e salino, que propiciaram que os isolados não formadores de biofilme passem a formá-lo, o que dificulta sua eliminação. SCN podem apresentar multirresistência, especialmente a meticilina, indicando a importância de ações que evitem a transmissão dessas bactérias de animais para os seres humanos através do consumo de produtos de origem animal contaminados.

Portanto, os resultados demonstram a relevância da adoção de Boas Práticas de Fabricação nas indústrias alimentícias, evitando a fixação, multiplicação e formação de biofilme por SCN potencialmente toxigênicos, impedindo a contaminação dos alimentos e das superfícies, evidenciando a importância de a legislação brasileira exigir contagens desse grupo de bactérias em análises de rotina.

Referências

ADHIKARI, R. P.; ARVIDSON, S.; NOVICK, P.; A Nonsense Mutation in *agrA* Accounts for the Defect in *agr* Expression and the Avirulence of *Staphylococcus aureus* 8325-4 *traP*:kan. **Infection and Immunity**, n.75, p.4534-40, 2007.

ABPA. Associação Brasileira de Proteína Animal. **Relatório Anual 2016**. http://abpa-br.com.br/storage/files/versao_final_para_envio_digital_1925a_final_abpa_relatorio_anual_2016_portugues_web1.pdf

ABPA – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEINA ANIMAL. **Relatório Anual 2017**.

[http://abpabr.com.br/storage/files/3678c_final_abpa_relatorio_anual_2016_portugues_web_reduzi do.pdf](http://abpabr.com.br/storage/files/3678c_final_abpa_relatorio_anual_2016_portugues_web_reduzi.pdf).

ABPA - Associação Brasileira de Proteína Animal. **Relatório Anual 2018**. <http://abpa-br.com.br/storage/files/relatorio-anual-2018.pdf>.

ABPA. Associação Brasileira de Proteína Animal. **Receita de exportações de carne suína cresce 31,6% em setembro. 2019**. <http://abpa-br.com.br/noticia/receita-de-exportacoes-de-carne-suina-cresce-316-em-setembro-2917>.

ALCARÁZ, L. E.; SATORRES, S. E.; LUCERO, R. M.; CENTORBI, O. N. P. Species identification, *slime* production and oxacillin susceptibility in coagulase-negative staphylococci isolated from nosocomial specimens. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.34, p.45-51, 2003.

ANDRÉ, M. C. D. P. B.; SANTOS, P. P.; CAMPOS, M. R. H.; BORGES, L. J.; SERAFINI, A. B. Utilização do antibiograma como ferramenta de tipagem fenotípica de *Staphylococcus aureus* isolados de manipuladores, leite cru e queijo minas frescal em laticínio de Goiás. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, p.102-108, 2006.

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.

ANTUNES, R. C. **O ensino da produção industrial de suínos - uma versão crítica**, 1a ed. Uberlândia, MG: Edibrás, p.29-60, 2018.

ARIAS, M. V. B; CARRILHO, C. M. D. M. Resistência antimicrobiana nos animais e no ser humano. Há motivo para preocupação? **Semina: Ciências Agrárias**, v.33, n.2, p.775-790, 2012.

ARCIOLA, C. R.; CAMPOCCIA, D.; GAMBERINI, S.; CERVELLATI, M.; DINATI, E.; MONTANARO, L. Detection of slime production by means of an optimised Congo red agar plate test based on a colourimetric scale in *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates genotyped for ica locus. **Biomaterials**, v.23, n.21, p.4233-4239, 2002.

ARGUDIN, M. A.; MENDOZA, C.; RODICIO, M.R. Food Poisoning and *Staphylococcus aureus* Enterotoxins. **Journal Toxins**, v.2, p.1751-1773, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001**. Aprova regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos. Brasília, DF. <http://portal.anvisa.gov.br/legislacao#/visualizar/26655>.

BRASIL. **Doenças transmitidas por alimentos: causas, sintomas, tratamento e prevenção**. Ministério da Saúde, 2019. <http://www.saude.gov.br/saude-de-a-z/doencas-transmitidas-por-alimentos>.

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

BALABAN, N.; CIRIONI, O.; GIACOMETTI, A.; GHISELLI, R.; BRAUNSTEIN, J.B.; SILVESTRI, C.; MOCHEGANI, F.; SABA, V.; SCALISE, G. Treatment of *Staphylococcus aureus* biofilm infection by the quorum sensing inhibitor RIP. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, n.51, p.2226- 29, 2007.

BARAN, A. B.; ERDOĞAN, A.; TURGUT, T.; ADIGÜZEL, M. C. A review on the presence of *Staphylococcus aureus* in cheese. **Journal of Nature and Science**, v.6, n. 2, p.100-105, 2017.

BHARGAVA K., ZHANG Y. Multidrug-resistant coagulase-negative Staphylococci in food animals. **Journal of Applied Microbiology**, v.113, p. 1027–1036, 2012.

BASANISI, M. G.; NOBILI, G.; LA BELLA, G.; RUSSO, R.; SPANO, G.; NORMANNO, G.; LA SALANDRA, G. Molecular characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from sheep and goat cheeses in southern Italy. **Small Ruminant Research**, v.135, p.17–19, 2016.

BERNARDI, T. A new device for rapid evaluation of biofilm formation potential by bacteria. **Journal of Microbiological Methods**, v.68, n.3, p.605-12, 2007.

BECKER, K.; HEILMANN, C.; PETERS, G. Coagulase negative staphylococci. **Clinical Microbiology Reviews**, v.27, n.4, p.870-926, 2014.

BOARI, Cleube Andrade et al. Formação de biofilme em aço inoxidável por *Aeromonas hydrophila* e *Staphylococcus aureus* usando leite e diferentes condições de cultivo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.29, n.4, p.886-895, 2009.

BRAVO, Melina Luz Mary Cruzado. **Estudo genotípico e fenotípico de *Staphylococcus* spp formadores de biofilme isolados em linhas de produção de queijo Minas Frescal e de leite de vacas com mastite no Estado de São Paulo, Brasil**, 2016. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

BUKOWSKI, M.; WLADYKA, B.; DUBIN, G. Exfoliative toxins of *Staphylococcus aureus*. **Toxins** 2, p.1148–1165, 2010.

CAFISO, V., BERTUCCIO, T., SANTAGATI, M., CAMPANILE, F., AMICOSANTE, G., PERILLI, M. G., SELAN, L., ARTINI, M., NICOLETTI, G., STEFANI, S. Presence of the *ica operon* in clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis* and its role in biofilm production. **Clinical Microbiology Infection**, v.10, p.1081-88, 2004.

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.

CHEN, T. R.; HSIAO, M. H.; CHIOU, C. S.; TSEN, H. Y.; Development and use of PCR primers for the investigation of C1, C2, and C3 enterotoxin types of *Staphylococcus aureus* strains isolated from food-borne outbreaks. **International Journal of Food Microbiology**, v.71, p.63-70, 2001.

CUNHA, M. L. R. ***Staphylococcus aureus* e estafilococos coagulase-negativa: virulência, resistência aos antimicrobianos e epidemiologia molecular**. 2012. 337p. Tese (livre-docência) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, 2012.

DICICCO, M.; NEETHIRAJAN, S.; SINGH, A.; WEESE, J. S. Efficacy of clarithromycin on biofilm formation of methicillin resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. **BMC Veterinary Research**, v.8, p.225-231, 2012.

DINGES, M. M.; ORWIN, P. M.; SCHLIEVERT, P. M.; Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. **Clinical Microbiology Reviews**, v.13, n.1, p.16-34, 2000.

DO AMARAL SOUZA, R.; SANTOS, E. L.; DA CONCEIÇÃO PONTES, E.; DE QUEIROZ COSTA, J. H.; DA SILVA, S. H. B.; TEMOTEO, M. C. & LINS, J. L. F. As tendências de mercado da carne suína. **Pubvet**, v.5, p.1157, 2011.

DOS ANJOS, Cláudia Moreira; GOIS, Franz Dias; PEREIRA, Cinthia Maria Carlos. Desmistificando a carne suína. **Pubvet**, v.12, p.136, 2018.

ERTAS, N.; GONULALAN, Z.; YILDIRIM, Y.; KUM, E. Detection of *Staphylococcus aureus* enterotoxins in sheep cheese and dairy desserts by multiplex PCR technique. **International Journal of Food Microbiology**, v.142, n.1–2, p.74–77, 2010.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA); THE EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL (ECDC). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017. **EFSA Journal**, v.16, n.12, 2017. Disponível em:

<https://www.ecdc.europa.eu/sites/portal/files/documents/zoonoese-food-borne-outbreaks-surveillance-2017-updated.pdf>

FERREIRA, J. M. C. N. **Genes enterotoxigênicos e resistência a antibióticos em isolados de *Staphylococcus coagulase positiva* de origem alimentar**. 2014. 101p. Dissertação (Mestrado em Inovação e Qualidade na Produção Alimentar) - Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Castelo Branco, Castelo Branco, Portugal, 2014.

FERREIRA, A.; MENDONÇA, R. C. S.; SOUZA TETTE, P. A.; DE SOUZA, A. S.; CARVALHO, M. M. Identificação fenotípica e genotípica de cepas de estafilococos oriundas de uma unidade de abate de aves. **Multi-Science Journal**, v.1, n.2, p.50-58, 2018.

FLEMMING, H. C.; NEU, T. R.; WOZNIAK, D. J. The EPS Matrix: The house of biofilm cells. **Journal of Bacteriology**, v.189, p.7945-7947, 2007.

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.

FOWOYO, P.T.; Ogunbanwo, S.T. Virulence and toxigenicity of coagulase-negative staphylococci in Nigerian traditional fermented foods. **Canadian Journal of Microbiology**, v.10, p.1–7, 2016.

FOX, L. K.; BESSER, T. E.; JACKSON, S. M. Evaluation of a coagulase-negative variant of *Staphylococcus aureus* as a cause of intramammary infections in a herd of dairy cattle. **Veterinary Medical Associates**, v.209, p. 1143-1146, 1996.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**, 2. ed. São Paulo: Atheneu. P.184, 2002.

FRAZIER, W.C.; WESHOF D.C. **Microbiologia de los alimentos**, Zaragoza, España, 2000.

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, p.872-874, 1989.

FREITAS, E. I. **Detecção de genes de enterotoxinas de *Staphylococcus sp.* isolados de queijo Minas Frescal**, 106 p. 2005. Dissertação (Mestrado) em Vigilância Sanitária. Instituto de Controle de Qualidade e Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

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.

GUIMARÃES, F. F. **Perfil de sensibilidade microbiana, pesquisa de gene mecA de resistência à meticilina e detecção molecular de genes codificadores de enterotoxinas, em espécies de estafilococos coagulase positiva e negativa isolados de mastites bovinas**. 2011. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Botucatu.

HAMMAD, A. M.; WATANABE, W.; FUJII, T.; SHIMAMOTO T. Occurrence and characteristics of methicillin-resistant and -susceptible *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant coagulase negative staphylococci from Japanese retail ready-to-eat raw fish. **International Journal of Food Microbiology**, v.156, p. 286–289, 2012.

HENNEKINNE, J.A.; DE BUYSER, M.L.; DRAGACCI, S. *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. **Federation of European Microbiological Society Microbiology Reviews**, v.36, p.815–836, 2012.

JAIN, A.; AGARWAL, A. Biofilm production, a marker of pathogenic potential of colonizing and comensal staphylococci. **Journal of Microbiological Methods**, v.76, p.88-92, 2009.

KITAMOTO, M.; KITO, K.; NIIMI, Y.; SHODA, S.; TAKAMURA, A.; HIRAMATSU, T.; AKASHI, T.; YOKOI, Y.; HIRANO, H.; HOSOKAWA, M.; YAMAMOTO, A.; AGATA, N.; HAMAJIMA, N. Food poisoning by *Staphylococcus aureus* at a university festival. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, v.62, p.242–243, 2009.

KLIBI, A.; MAAROUFI, A.; TORRES, C.; JOUINI, A. Detection and characterization of methicillin-resistant and susceptible coagulase-negative staphylococci in milk from cows with clinical mastitis in Tunisia. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.52, n.6, p.930-935, 2018.

KONDO, Y.; ITO, T.; MA X, X.; WATANABE, S.; KREISWIRTH, B. N.; ETIENNE, J.; HIRAMATSU, K. Combination of multiplex PCRs for staphylococcal cassette chromosome mec type assignment: Rapid identification system for mec, ccr, and major differences in junkyard regions. **Antimicrobial Agents Chemother**, v.51, p.264–274, 2007.

LE, K.; DASTGHEY, S.; HO, T.; OTTO, M. Molecular determinants of *staphylococcal* biofilm dispersal and structuring. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v.4, p.167, 2014.

LIN, Z.; KOTLER, D.P.; SCHLIEVERT, P. M.; SORDILLO, E. M. Staphylococcal enterocolitis: forgotten but not gone? **Digestive Diseases and Sciences**, v.55, p.1200-1207, 2010.

LUCCHESI, E. G. **Desenvolvimento de sistema de obtenção de biofilmes in vitro e a avaliação de sua susceptibilidade a biocidas**. 2006. 77f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

LUZ, I. S. Caracterização molecular das toxinas em *Staphylococcus aureus* isolados de leite e queijo de coalho em municípios da Região Agreste de Pernambuco. 2008. 125p. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2008.

MARTIN, B.; GARRIGA, M.; HUGAS, M.; BOVER-CID, S.; VECIANA-NOGUES, M. T.; AYMERICH, T. Caracterização molecular, tecnológica e de segurança de cocos Gram-positivos para catalase-positivos de embutidos levemente fermentados. **Revista Brasileira de Microbiologia Alimentar**, v.107, p.148–158, 2006.

MCLAUCHLIN, J.; NARAYANAN, G. L.; MITHANI, V.; O'NEILL, G. A detecção de enterotoxinas e genes de toxinas da síndrome do choque tóxico em *Staphylococcus aureus* por reação em cadeia da polimerase. **Journal of Food Protection**, v.63, p.479–488, 2000.

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

MICUSAN, V. V.; THIBODEAU, J. Superantigens of microbiol origin. **Immunol**, v.5, p.3-11, 1993.

MONROE, E. D. Looking for Chinks in the Armor of Bacterial Biofilms. **PloS Biology**, v.5, n.11, p.2458-2461, 2007.

MOURA, T. M.; CAMPOS, F. S.; D'AZEVEDO, P. A.; VAN DER SAND, S. T.; FRANCO, A. C.; FRAZZON, J.; FRAZZON, A. P. Prevalence of enterotoxin-encoding genes and antimicrobial resistance in coagulase-negative and coagulase-positive *Staphylococcus* isolates from black pudding. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.45, p.579–585, 2012.

MURLIKI, B. **Um panorama crítico sobre doenças transmitidas por alimentos no Brasil entre 2000 e 2016**, 53 f. 2018. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Saúde Coletiva) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Porto Alegre, 2018.

O'GARA, J. P.; HUMPHREYS, H. *Staphylococcus epidermidis* biofilms: importance and implications. **Journal of medical microbiology**, v.50, n.7, p.582-587, 2001.

OLIVEIRA, M. M. M.; BRUGNERA, D. F.; PICCOLI, R. H. Biofilmes microbianos na indústria de alimentos: uma revisão. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v.69, n.3, p.277-84, 2010.

OLIVEIRA, A. M.; PADOVANI, C. R.; NAGO, N. T.; & ANA, A. S. S. High Incidence of Enterotoxin D Producing *Staphylococcus* spp. in Brazilian Cow's Raw Milk and Its Relation with Coagulase and Thermonuclease Enzymes. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.8, n.1, p.159–163, 2011.

OLIVEIRA, K. M. L.; CARVALHO, J. B.; RAMOS, L. P. S.; GELATTI, L. C. Presença de *Staphylococcus aureus* em queijos artesanais comercializados na cidade de Uruaçu – Goiás. **Revista Eletrônica de Ciências Humanas, Saúde e Tecnologia**, v.8, n.2, 2015.

OTTO, M. *Staphylococcal* infections: Mechanisms of biofilm formation maturation and detachment as critical determinants of pathogenicity. **Annual Review of Medicine**, v.64, p.175-188, 2013.

PARK, J. Y.; FOX, L. K.; SEO, K. S.; MCGUIRE, M. A.; PARK, Y. H.; RURANGIRWA, F. R.; SISCHO, W. M.; BOHACH, G. A. Detection of classical and newly described staphylococcal superantigen genes in coagulase-negative staphylococci isolated from bovine intramammary infections. **Veterinary Microbiology**, v.147, n.1-2, p.149–154, 2011.

PASSOS, E. C.; ALMEIDA, A. S.; MELLO, A. R. P. Presença de *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* em surto de toxinfecção alimentar ocorrido na região do Vale do Ribeira. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v.71, n.4, p.713-717, 2012.

PIRES, C. E. de T. **Principais bactérias Presentes em Doenças transmitidas por alimentos (DTAs)**. Monografia (Graduação em Medicina Veterinária) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

PODKOWIK, M.; BYSTROŃ, J.; BANIA, J. Genotypes, antibiotic resistance, and virulence factors of staphylococci from ready-to-eat food. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.9, n.1, p.91–93, 2012.

PODKOWIK, M.; PARK, J. Y.; SEO, K. S.; BYSTROŃ, J.; & BANIA, J. Enterotoxigenic potential of coagulase-negative staphylococci. **International journal of food microbiology**, v.163, n.1, p.34-40, 2013.

RAHIMI, E.; ALIAN, F. Presence of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in cow, camels, sheep, goat, and buffalo bulk tank milk. **Veterinarski Arhiv**, v.83, n.1, p.23–30, 2013.

ROÇA, R.O. **Composição Química da Carne**. Botucatu: FCA-UNESP, p.10, 2000.

SANTOS, R. O. **Perfil de resistência de *Staphylococcus coagulase negativa* isoladas de queijos coalho comercializados no município de Lagarto-SE**, 2018.

SHAW, L. N.; JONSSON, I. M.; SINGH, V. K.; TARKOWSKI, A.; STEWART, G. S. Inactivation of traP Has No Effect on the Agr Quorum-Sensing System or Virulence of *Staphylococcus aureus*. **Infection and Immunity**, n.75, p.4519-27, 2007.

SCHLEIFER, K. H.; BELL, J. A. **Staphylococcus** *Bergey's Manual of Arquea and Bacteria*, 2.ed. London New York. v.3, p.1445, 2015.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M. H.; DOS SANTOS, R. F. S.; GOMES, R. A. R. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimento e água**. São Paulo: Varela, 2010.

SILVA, S. S. P. **Genes para enterotoxinas em *Staphylococcus* sp. isolados de manipuladores de alimentos de um restaurante universitário na cidade do Natal – RN**. Dissertação de Mestrado para obtenção do título de Mestre em Biologia Parasitária na área de Microbiologia. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2015.

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.

SIMEONI, D.; RIZZOTI, L.; COCCONCELLI, O.; GAZZOLA, S.; DELLAGLIO, F.; TORRIANI, S. Genes de resistência a antibióticos e identificação de estafilococos coletados da cadeia de produtos suínos. **Microbiologia de Alimentos**, v.25, p.196-201, 2008.

SOARES, M. J. S.; TOKUMARU-MIYAZAKI, N. H.; NOLETO A. L. S.; FIGUEIREDO, A. M. Enterotoxin production by *Staphylococcus aureus* clones and detection of Brazilian epidemic MRSA clone (11I::B:A) among isolates from food handlers. **Journal of Medical Microbiology**, vol.46, n.2, p.14-22, 1997.

SOUZA, K. S. S.; OLIVEIRA, Y. C. M.; DUARTE, A. F. D. et al. Resistência a antimicrobianos de bactérias isoladas de vacas leiteiras com mastite subclínica. **Caderno de Ciências Agrárias**, v.8, n.2, p.83-89, 2016.

USDA. United States Department of Agriculture. **Livestock and Poultry: World Markets and Trade**.

https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/livestock_poultry.pdf.

VAN BOECKEL, T. P.; BROWER, C.; GILBERT, M.; GRENFELL, B. T.; LEVIN, S. A.; ROBINSON, T. P.; LAXMINARAYAN, R. Global trends in antimicrobial use food animals. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.112, n.18, p.5649-5654, 2015.

VASCONCELOS, N. G.; PEREIRA, V. C.; ARAUJO, J. P.; DA CUNHA, M. Molecular detection of enterotoxins E, G, H and I in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci isolated from clinical samples of newborns in Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, v.111, n.3, p.749–762, 2011.

WANG, J.; WEI, X.; FAN, M. Assessment of Antibiotic Susceptibility within Lactic Acid Bacteria and Coagulase-Negative Staphylococci Isolated from Hunan Smoked Pork, a Naturally Fermented Meat Product in China. **Journal of food science**, v.83, n.6, p.1707-1715, 2018.

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

ZSCHÖCK, M.; MANHOLD-MAURER, S.; WESCHER, A.; MERL, K.; KHAN, I.; LÄMMLER, C. Evaluation of tRNA intergenic spacer length polymorphism analysis as a molecular method for species identification of streptococcal isolates from bovine mastitis. **Journal of Dairy Research**, v.72, p.333-337, 2005.