

Identificação fenotípica e genotípica de cepas de estafilococos oriundas de uma unidade de abate de aves

Andreza Angélica Ferreira¹, Regina Célia Santos Mendonça¹, Patrícia Amaral de Souza Tette², Ariana de Souza Soares¹, Marcia Maria de Carvalho³

RESUMO

Vários tipos de alimentos são implicados em intoxicações gastrointestinais por *Staphylococcus aureus*, sendo frequentemente relacionado com carne e derivados, devido às propriedades de atividade de água, pH, nutrientes e a extensiva manipulação destes alimentos durante o processamento. Este trabalho teve por objetivo identificar cepas potencialmente toxigênicas de *Staphylococcus* isoladas de diferentes nichos em uma unidade de abate de frango de corte, bem como avaliar a resistência a diferentes antimicrobianos. De um total de 120 isolados, 75 foram considerados como típicos do gênero *Staphylococcus*, sendo 63,7% coagulase positiva e 37,3% coagulase negativa. Pela técnica de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) confirmou-se que 86,67% dos isolados eram pertencentes ao gênero *Staphylococcus* pela detecção do gene *tuf* e 77,33% da espécie *S. aureus* pela amplificação do gene *nuc*. Verificou-se a presença do gene *sec* em duas cepas, sendo uma delas estafilococos coagulase negativa. A maioria dos isolados foram resistentes à sulfonamida (98,5%), ácido nalidíxico (89,3%) e penicilina G (87,70%). Dentre os isolados resistentes à penicilina, 4,60% foram oxacilina resistentes e 1,5% vancomicina resistentes.

Palavras-chave: *Staphylococcus aureus*; coagulase negativa; resistência à antibióticos; enterotoxinas.

Phenotypic and genotypic identification of staphylococcal strains from a poultry processing unit

ABSTRACT

Several types of food are involved in gastrointestinal poisoning caused by *Staphylococcus aureus*. Meat and meat products are often associated with this pathogen due to water activity properties, pH, nutrients and extensive manipulation during processing. This aim of this study was to identify the potentially toxigenic strains of *Staphylococcus* isolated from different niches of a poultry processing unit and evaluate the resistance to different antibiotics. From a total of 120 isolates, 75 were considered typical of the *Staphylococcus* genus, 63.7% coagulase-positive and 37.3% coagulase negative. Through Polymerase Chain Reaction (PCR), 86.67% of the isolates were confirmed as *Staphylococcus* genus by detecting the *tuf* gene and 77.33% of the *S. aureus* species by amplification of the *nuc* gene. The presence of the *sec* gene was observed in two strains, one of them coagulase-negative staphylococci. Most of the isolates were resistant to sulfonamide (98.5%), nalidixic acid (89.3%) and penicillin G (87.70%). Among the resistant to penicillin ones, 4.60% were oxacillin resistant and 1.5% vancomycin resistant.

Keywords: *Staphylococcus aureus*; coagulase-negative; resistance to antibiotics; enterotoxin.

Autor para correspondência: Andreza Angélica Ferreira
Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil.
E-mail: andreza88@gmail.com
Recebido em: 21 abr. 2015
Aceito em: 21 mai. 2015
Editor responsável: Prof. Dr. Guilherme Malafaia

¹Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil.

²Universidade Federal de Minas Gerais, MG, Brasil.

³Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas, MG, Brasil.

INTRODUÇÃO

Estafilococos produzem e secretam 30 ou mais fatores de virulência específicos que interferem nos sistemas de defesas do hospedeiro (Dinges, Orwin, & Schlievert, 2000). Vários desses fatores de virulência envolvidos na patogênese de *Staphylococcus aureus* são descritos na literatura (Kérouanton et al., 2007; Kumar, Negi, Gaur, & Khanna, 2009; Lamaita et al., 2005; Novick, Schlievert, & Ruzin, 2001; Pelisser, Klein, Ascoli, Zotti, & Arisi, 2009). A produção de enterotoxinas é considerada um dos principais fatores de virulência do gênero. Algumas espécies produzem enterotoxinas em temperaturas que variam entre 10°C e 46°C, contudo, a temperatura ótima está entre 40°C e 45°C (Jay, 2005).

A intoxicação alimentar causada por este micro-organismo é devido à ingestão de enterotoxinas produzidas e liberadas pela bactéria durante sua multiplicação no alimento. A enterotoxina estafilocócica é termoestável e pode estar presente no alimento após tratamentos térmicos como a pasteurização. Mesmo em seu estado ativo, as toxinas resistem à ação de enzimas proteolíticas como pepsina, tripsina, quimiotripsina, papaína e renina, o que possibilita a instalação de um quadro de intoxicação de origem (Le Loir, Baron, & Gautier, 2003).

Vários tipos de alimentos são implicados em intoxicações gastrointestinais por *Staphylococcus aureus*, sendo frequentemente relacionado com carne e derivados, devido às propriedades de atividade de água, pH, nutrientes e a extensiva manipulação destes alimentos durante o processamento (Ananou, Maqueda, Martínez-Bueno, Gálvez, & Valdivia, 2005).

Há relatos envolvendo alimentos nos últimos anos que confirmam a capacidade de estafilococos coagulase negativa (SCN) para produzir enterotoxinas (Aye, Gautam, Reyaz, Vinson, & Ps, 2014; Cunha, Peresi, Oliveira Calsolari, & Araújo, 2006; Park et al., 2011; Veras et al., 2008; Zell et al., 2008). A presença de sequências homólogas a enterotoxinas de *S. aureus* foi confirmada nos genomas de cepas SCN utilizados no processamento de alimentos, associadas com a infecção humana e de outros ambientes (Podkowik, Park, Seo, Bystroní, & Bania, 2013).

A resistência aos antimicrobianos pelo gênero *Staphylococcus* está associada à existência de genes presentes no micro-organismo que codificam proteínas relacionadas a diferentes mecanismos bioquímicos que impedem a ação dos antibióticos. Sendo que a característica da resistência a determinado antimicrobiano pode estender-se a outros, por isso torna-se importante estudar a susceptibilidade de cepas à diversos

antibióticos. Além disso, *S. aureus* é um organismo tolerante à dessecação, com a capacidade de persistir em ambientes potencialmente secos e de stress, como mucosas, pele humana, roupas e superfícies de ambientes (Chaibenjawong & Foster, 2011). Cerca de 30-50% da população humana é portadora assintomática de cepas deste gênero (Le Loir et al., 2003).

Portanto, a patogenicidade deste gênero pode estar associada a uma combinação de fatores mediados por produção de toxinas, resistência à antibióticos e capacidade de se multiplicar em diferentes condições.

Ao considerar que muitas das etapas do processamento de carnes são realizadas manualmente e que os cortes podem ficar expostos sobre as mais variadas superfícies, este trabalho teve por objetivo identificar cepas potencialmente toxigênicas de *Staphylococcus* isoladas de diferentes nichos em uma unidade de abate de frango de corte, bem como avaliar a resistência a diferentes antimicrobianos.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta de amostras e metodologia de análise

Em uma unidade de abate de frango de corte sob regime de Inspeção Federal (SIF), foram coletadas amostras em cinco diferentes pontos da superfície ao longo da calha de evisceração, cinco diferentes utensílios (facas e chairs), mãos de vinte manipuladores e dez amostras de carcaças de frango (cinco antes da entrada no pré-chiller e cinco após a saída do chiller), totalizando quarenta amostras. Para a coleta de amostras de superfícies, utensílios e mãos foi utilizada a técnica de esfregão com auxílio de *swab*, de acordo com a metodologia adaptada por Andrade (2008), o qual o *swab* foi imerso em caldo de infusão cérebro e coração (BHI, Difco™). Para superfícies utilizou-se uma área delimitada de 250 cm²; para utensílios e mãos o *swab* foi realizado por unidade. Na coleta das amostras de carcaças de frango usou-se a técnica de rinsagem recomendada pelo Foods and Drugs Administration (FDA, 1996). As carcaças foram colocadas em sacos plásticos esterilizados adicionados de 400 mL de tampão fosfato estéril. Após a rinsagem com o tampão, 30 mL do fluido foi utilizado para análise.

Isolamento das cepas e extração do DNA genômico

As cepas foram isoladas conforme descrito na Instrução Normativa n° 62 (Brasil, 2003). Foram selecionadas de cada placa três colônias típicas (cor preta com halo translúcido) e atípicas. As colônias foram estriadas e purificadas em Ágar Padrão para Contagem (PCA, Difco™) e mantidas em caldo BHI com 20% de glicerol à -20°C. Posteriormente,

realizou-se a prova de coagulase, teste de catalase e coloração de Gram (Brasil, 2003).

A extração do DNA genômico dos isolados de *Staphylococcus* spp. foi realizada a partir de um mililitro da cultura bacteriana de acordo com o protocolo descrito por Ferreira et al. (2014). Posteriormente, as amostras de DNA obtidas foram quantificadas em espectrofotômetro a 260 nm (NanoDrop®).

Identificação de gênero e espécie de *Staphylococcus* por PCR

As sequências dos oligonucleotídeos (Sigma®, Brasil) para amplificação dos genes *tuf* (F - GGC CGT GTT GAA CGT GGT CAA ATC A; R - TIA CCA TTT CAG TAC CTT CTG GTA A) e *nuc* (F - CAA GGC TTG GCT AAA GTT GC; R - CTG AAT CAG CGT TGT CTT CG) foram obtidas de acordo com Martineau et al. (2001) e Poli et al. (2007) respectivamente. Para amplificação dos genes relacionados à síntese de toxinas as sequências dos oligonucleotídeos (Sigma®, Brasil) *sea* (F - CCT TTG GAA ACG GTT AAA ACG; R - TCT GAA CCT TCC CAT CAA AAA C); *seb* (F - TCG CAT CAA ACT GAC AAA CG; R - GCA GGT ACT CTA TAA GTG CCT GC); *sec* (F - CTC AAG AAC TAG ACA TAA AAG CTA GG; R - TCA AAA TCG GAT TAA CAT TAT CC); *sed* (F - CTA GTT TGG TAA TAT CTC CTT TAA ACG; R - TTA ATG CTA TAT CTT ATA GGG TAA ACA TC) foram obtidas por Becker, Roth, & Peters (1998).

As reações de PCR-Uniplex para a pesquisa dos genes *tuf* (gênero *Staphylococcus*), *nuc* (espécie *S. aureus*), *sea*, *seb*, *sec* e *sed* para toxina tipo A, toxina tipo B, toxina tipo C e toxina tipo D, respectivamente, foram realizadas separadamente. A mistura da reação consistiu de 0,4 µM de cada oligonucleotídeo, 0,3 µM de dNTP, 1,5 mM do MgCl₂, tampão da enzima Taq DNA polimerase (Promega) na concentração de 1x, 50 ng do DNA genômico e 1 U de Taq DNA polimerase (Promega) para um volume final de 25 µL. As amplificações foram realizadas em termociclador (THERM 1000/Maxygene), obedecendo-se a sequência de desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguido por 30 ciclos térmicos, cada um consistindo de 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos e, posteriormente, com uma etapa de extensão final a 72°C por 5 minutos. Para a amplificação dos genes *sea* e *seb* usou-se temperatura de anelamento de 57°C e mantiveram-se as demais condições. Posteriormente, cinco microlitros do produto amplificado foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% com a utilização de marcador de peso molecular de 100 pb (BioLabs®). Após a eletroforese, o gel foi visualizado em transiluminador utilizando sistema

de documentação de gel pelo software ST4 Quantum - 1000 / 26mX.

Como controle positivo deste experimento utilizou-se cepas de referência de *S. aureus* descritas na Tabela 1.

Tabela 1. Controles positivos de *Staphylococcus aureus* utilizados

Cepas	Genes identificados
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538)	<i>tuf</i> e <i>nuc</i>
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 8095)	<i>sea</i>
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 14458)	<i>seb</i>
<i>Staphylococcus aureus</i> (FRI 722n)*	<i>sea</i>
<i>Staphylococcus aureus</i> (FRI S-6)*	<i>seb</i>
<i>Staphylococcus aureus</i> (FRI 361)*	<i>sec</i>
<i>Staphylococcus aureus</i> (FRI 1151m)*	<i>sed</i>

*culturas toxigênicas de *S. aureus* doadas pelo Prof. Luiz Simeão do Carmo do Laboratório de Microbiologia e Ecologia Microbiana da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

Sensibilidade dos isolados a antimicrobianos

Os isolados de *Staphylococcus* spp. foram submetidos ao teste de antibiograma por meio da técnica de difusão em disco de acordo com a metodologia descrita por Bauer et al. (1966). As culturas foram incubadas a 37°C à uma densidade óptica 0,5 mensurada em espectrofotômetro (Biospectro) com comprimento de onda de 640 nm. Em seguida com o auxílio de um *swab* cada cultura foi semeada em Ágar Mueller-Hinton (Difco™) e utilizou-se os seguintes discos impregnados com antibióticos: ácido clavulânico + amoxicilina (30 µg), ácido nalidíxico (30 µg), ampicilina (10 µg), cefalotina (30 µg), cefoxitina (30 µg), ciprofloxacina (5 µg), clindamicina (2 µg), cloranfenicol (30 µg), eritromicina (15 µg), estreptomina (10 µg), gentamicina (10 µg), oxacilina (1 µg), penicilina G (10 U), rifampicina (5 µg), sulfonamida (300 µg), tetraciclina (30 µg) e vancomicina (30 µg). Os diâmetros das zonas de inibição foram interpretados após 24 h de incubação a 37 °C, de acordo com o Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2007).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Identificação bioquímica e molecular

Foram isoladas 120 colônias típicas e atípicas em Ágar Baird-Parker. Após realização de provas bioquímicas, 75 foram consideradas cepas

típicas do gênero *Staphylococcus* spp. (Tabela 2). Observou-se um maior número de isolados oriundos de manipuladores. Isto demonstra a possibilidade de contaminação cruzada entre as carcaças na linha de abate. Na calha de evisceração também foi possível isolar colônias típicas do patógeno em número relativamente baixo, o que pode ser devido à lixívia e arraste pela água que flui constantemente pela calha. Não foi possível isolar colônias típicas em carcaças após resfriamento em

chiller, apesar de terem sido isoladas nas carcaças avaliadas antes da entrada neste. Isto se deve provavelmente pela lixívia provocada pela água de resfriamento. Os utensílios utilizados, como facas e chairas devem ser devidamente higienizados e esterilizados após o uso em cada carcaça. Apesar da prática de higienização ser adotada no estabelecimento avaliado, ainda foi possível isolar colônias típicas nesses utensílios, o que enfatiza a necessidade de maior controle.

Tabela 2. Ocorrência de isolados de *Staphylococcus* spp. provenientes de diferentes nichos em um indústria de abate de aves

Amostras	Número de isolados	Coagulase	
		Positiva (%)	Negativa (%)
Manipulador	44	54,6	45,4
Carcaça pré-chiller	14	85,7	14,3
Utensílio	9	78,0	22,0
Superfície	8	50,0	50,0
Total	75	62,7	37,3

De uma forma geral, nem todas as cepas de estafilococos presentes em alimentos são enterotoxigênicas, entretanto, testes de coagulase e termonuclease são considerados eficientes para identificação de cepas potencialmente enterotoxigênicas (Le Loir et al., 2003; Linage, Rodriguez-Calleja, Otero, Garcia-Lopez, & Santos, 2012).

A enzima coagulase indica potencial de virulência por proteger as células da fagocitose, uma vez que é responsável pelo revestimento das células bacterianas por estar presente na superfície da parede celular e associar-se com a conversão direta de fibrinogênio em fibrina (Sandel e McKillip, 2004).

A identificação de cepas coagulase negativa isoladas de alimentos associadas com potencial virulento tem sido frequente. Oliveira et al. (2011) identificaram cepas enterotoxigênicas de *S. aureus* coagulase negativa oriundas de leite de vaca produzido no Brasil. Landeta et al. (2013) avaliaram propriedades tecnológicas relacionadas com a segurança alimentar em cepas SCN em produtos cárneos curados na Espanha e constataram que algumas cepas não poderiam ser selecionadas como cultura *starter*, uma vez que apresentaram diversos fatores de virulência. Rebecchi et al. (2015) detectaram oito cepas SCN resistentes à antibiótico isoladas de amostras de salame Piacentino em diferentes etapas ao longo do processo de fabricação.

Estes dados ressaltam a importância de alterações na legislação brasileira (Brasil, 2001) que até os dias atuais dispõe sobre a enumeração de estafilococos coagulase positiva (SCP) com o

objetivo de substituir a determinação de *Staphylococcus aureus*.

A identificação de cepas SCP e SCN pode auxiliar na avaliação microbiológica dos produtos cárneos destinados ao consumidor final. A presença destas cepas relaciona-se com a falta de práticas higiênicas-sanitárias adequadas, sendo necessário um maior controle na aplicação das boas práticas de fabricação para prevenir contaminações e intoxicação alimentar.

Dos 75 isolados típicos pelas provas bioquímicas, 65 (86,6%) foram confirmados por PCR como do gênero *Staphylococcus* e 58 (77,33%) foram identificados como *S. aureus*. O produto da amplificação mensurado no *software* Quantum ST4 apresentou-se com aproximadamente 470 pb para o gene *tuf* (Figura 1A). Dos 65 isolados positivos na amplificação para o gene *tuf*, 58 apresentaram produto amplificado de 240 pb para o gene *nuc* (Figura 1B), que confirma a espécie *S. aureus*.

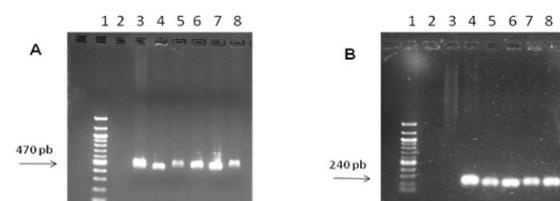


Figura 1 - Identificação molecular de estirpes de *Staphylococcus* spp. A – Identificação molecular do gênero *Staphylococcus* spp. pela amplificação do gene *tuf*, linha 1: marcador de peso molecular 100 pb (BioLabs®); linha 2: controle negativo; linhas 3-7: resultados positivos; linha 8: controle positivo *S. aureus* (ATCC 6538). B - Identificação molecular da espécie *S. aureus* pela amplificação do gene *nuc*, linha 1: marcador de peso molecular 100pb (BioLabs®); linha 2: controle negativo; linha 3: resultado negativo; linha 4-7: resultados positivos; linha 8: controle positivo *S. aureus* (ATCC 6538).

Observou-se um maior número de isolados de *S. aureus* provenientes de carcaças e manipuladores (Tabela 3). Isto indica uma possível

contaminação cruzada durante o abate, preparação e evisceração das carcaças pelos manipuladores.

Tabela 3. Prevalência de *Staphylococcus* spp. e *Staphylococcus aureus* de acordo com a origem

Cepas	Quantidade de cepas	Coagulase		Toxinas	Origem
		positiva	negativa		
<i>Staphylococcus aureus</i>	35	22	13	1	Manipulador ^a
<i>Staphylococcus aureus</i>	5	3	2	-	Superfície ^b
<i>Staphylococcus aureus</i>	14	12	2	-	Carcaça ^c
<i>Staphylococcus aureus</i>	4	4	-	-	Utensílio ^d
<i>Staphylococcus</i> spp.	3	1	2	1	Manipulador ^a
<i>Staphylococcus</i> spp.	1	1	-	-	Superfície ^b
<i>Staphylococcus</i> spp.	3	3	-	-	Utensílio ^d

^amãos de manipuladores do abatedouro de aves; ^bsuperfícies (calha) de aço inoxidável AISI 304 tipo 4; ^ccarcaças de frango; ^dfacas e chairas utilizadas na indústria de aves.

Dentre as 58 cepas de *S. aureus*, 70,7 % foram identificadas como coagulase positiva e 29,3 % como coagulase negativa. A identificação de *S. aureus* coagulase negativa neste estudo ressalta a importância da pesquisa deste micro-organismo em alimentos. Isto confirma que não se pode caracterizar apenas a espécie *S. aureus* como produtora de coagulase, uma vez que dentro do gênero outras espécies também são capazes de produzir a enzima coagulase, como *Staphylococcus delphini*, *Staphylococcus hycus*, *Staphylococcus intermedius* e *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans* (Jay, 2005).

Fox et al. (1996) também reportaram o isolamento de cepas de *S. aureus* produtores de pouca ou nenhuma coagulase, portanto classificadas como estafilococos coagulase negativa. Esses autores ressaltaram que os métodos genotípicos empregados para a identificação dessas cepas confirmaram as identificações fenotípicas, o que excluiu qualquer possibilidade de erro. A enumeração de apenas SCP em alimentos pode subestimar o grau de contaminação por *Staphylococcus* potencialmente enterotoxigênicos. Em outros estudos foi identificado o potencial toxigênico de estafilococos coagulase negativa (Cunha et al., 2006; Guimaraes et al., 2013; Lamaita et al., 2005; Park et al., 2011; Veras et al., 2008).

Ao avaliar a presença dos genes que codificam a produção de toxinas, detectou-se 2,67% das cepas com a presença do gene *sec* com um produto de amplificação de 400 pb, provenientes de manipuladores (Figura 2C). Dentre essas cepas toxigênicas, 1,33% foram identificadas como *S. aureus* coagulase negativa. E nenhum dos isolados amplificaram os demais genes relacionados à produção de toxina (Figura 2).

Entretanto, mesmo que a incidência de genes toxigênicos nas cepas avaliadas tenha sido

baixa, ainda há uma preocupação a respeito de linhagens virulentas entre os isolados. A identificação molecular em nível de espécie de *S. aureus* permitiu uma rápida detecção de um grande número de cepas com a presença do gene *nuc*, que codifica a produção de termonuclease responsável pela clivagem do DNA ou RNA do hospedeiro.

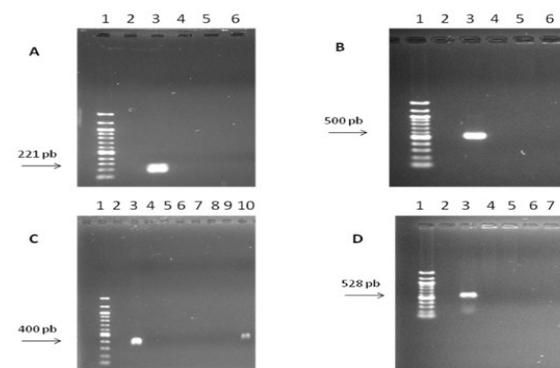


Figura 2 - Identificação molecular de genes toxigênicos. A – Identificação molecular do gene *sea* em *S. aureus*, linha 1: marcador de peso molecular 100 pb (BioLabs®); linha 2: controle negativo; linha 3: controle positivo *S. aureus* (ATCC 8095); linhas 4-6: resultados negativos. B – Identificação molecular do gene *seb* em *S. aureus*, linha 1: marcador de peso molecular 100pb (BioLabs®); linha 2: controle negativo; linha 3: controle positivo *S. aureus* (ATCC 14458); linhas 4-6: resultados negativos. C – Identificação molecular do gene *sec* em *S. aureus*, linha 1: marcador de peso molecular 100pb (BioLabs®); linha 2: controle negativo; linha 3: controle positivo *S. aureus* (FRI 361); linhas 4-9: resultados negativos; linha 10: resultado positivo. D - Identificação molecular do gene *sed* em *S. aureus*, linha 1: marcador de peso molecular 100pb (BioLabs®); linha 2: controle negativo; linha 3: controle positivo *S. aureus* (FRI 1151m); linhas 4-7: resultados negativos.

Perfil de sensibilidade ou resistência de *Staphylococcus* spp. à antimicrobianos

Dentre as cepas avaliadas 87,70% foram resistentes à penicilina G. Este resultado indica o uso indiscriminado deste antibiótico, o que possivelmente tem sido responsável pela seleção de linhagens resistentes, não sendo portanto indicado o uso deste antimicrobiano para o tratamento de infecções estafilocócicas. Penicilina é uma denominação genérica de um amplo grupo de antibióticos (penicilina G, penicilina V, oxacilina, diicloxacilina, nafcilina, ampicilina, amoxicilina, ticarcilina e piperacilina), classificados como β -lactâmicos que inibem a síntese da parede celular. A parede celular das bactérias constitui-se de um polissacarídeo (polímero de peptidoglicano) de estrutura essencial que protege a membrana citoplasmática da ruptura osmótica. Os β -lactâmicos agem por inativação de enzimas denominadas proteínas de ligação à penicilina (PLP's) ou penicilinases, durante a biosíntese do peptidoglicano (Cho, Uehara, & Bernhardt, 2014).

Penicilinas semi-sintéticas, como oxacilina e ampicilina, foram desenvolvidas a fim de inibir a ação das penicilinases. Neste estudo, 93,85 % das cepas foram sensíveis à oxacilina e 60,0 % à ampicilina (Figura 3). Entretanto, há cepas de *S. aureus* resistentes à oxacilina (ORSA) ou metilicilina (MRSA), isoladas de ambientes relacionados aos serviços de saúde e na comunidade. Entre os casos notificados de patógenos associados com infecções primárias, observou-se uma maior taxa de resistência à oxacilina de 52,9% para *S. aureus* e 75,1% entre as amostras de *Staphylococcus* coagulase negativa em pacientes adultos hospitalizados em UTI's brasileiras em 2012. E um percentual de 48,0% entre os isolados de *S. aureus* e 72,3% para SCN em UTI's pediátricas (Anvisa, 2014). No presente estudo, somente 4,61% das linhagens foram resistentes à oxacilina.

O uso combinado de β -lactâmicos com outro agente antibacteriano que inibe a ação de β -lactamases tem sido efetivo contra cepas do gênero *Staphylococcus*. Observou-se no presente estudo que 81,54% dos isolados foram sensíveis a ácido clavulânico associado à amoxicilina.

As cefalosporinas fazem parte do grupo dos cefens e possuem boa ação sobre *S. aureus* produtores de penicilinases. O seu mecanismo de ação é semelhante ao mecanismo das penicilinas por interferirem na síntese da parede celular. Elas são divididas em quatro categorias de acordo com o espectro de atividade. Aquelas de primeira geração incluem as cefalotinas que apresentam boa atividade sobre bactérias Gram-positivas, porém menor ação em cepas de *S. aureus* oxacilina ou metilicilina resistente (Reese et al., 2002). Todas as cepas foram sensíveis à cefalotina, inclusive as ORSA. As cefalosporinas de segunda geração

compreendem as cefoxitinas que possuem maior atividade sobre bactérias Gram-negativas comparadas as cefalotinas. Dentre os isolados 95,4% foram sensíveis a esse antibiótico.

Os glicopeptídeos são um grupo de agentes antimicrobianos que possuem ação direcionada a bactérias Gram-positivas, por exemplo, a vancomicina que passou a ser utilizada como um dos últimos recursos para tratar infecções causadas por cepas ORSA. No entanto, a prescrição deste antibiótico é cada vez mais frequente, muitas vezes de forma indiscriminada, o que contribui para a emergência de *S. aureus* resistentes a vancomicina (VRSA). No presente estudo, 1,5% das cepas foram resistentes à vancomicina. Entretanto, dentre as cepas ORSA nenhuma foi VRSA, não sendo detectada nenhuma co-relação de resistência entre essas cepas.

No entanto, em julho de 2002, o Centers for Disease Control (CDC) dos EUA publicou o primeiro relatório de identificação de *S. aureus* resistente à vancomicina e metilicilina. A infecção ocorreu em um paciente diabético com insuficiência renal crônica que fazia diálise peritoneal em um hospital em Michigan.

A eritromicina faz parte do grupo dos macrolídeos, em geral possui ação bacteriostática, mas dependendo das condições podem ser bactericidas. Possuem boa atividade sobre microorganismos Gram-positivos e Gram-negativos e agem sobre a inibição da síntese proteica (Reese et al., 2002). Observou-se que 21,55% e 52,30% dos isolados foram resistentes e resistentes intermediários à eritromicina.

Outro antibiótico muito utilizado é a tetraciclina associado às suas propriedades farmacocinéticas superiores, menor toxicidade, tolerância aumentada e menor custo. Este antibiótico age como bacteriostático por inibir a síntese proteica em nível de ribossomo em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Reese et al, 2002). Um percentual de 70,77% das cepas foram sensíveis à tetraciclina, o que representa boa atividade, uma vez que é um dos antibióticos mais prescritos em todo o mundo.

Outros inibidores da síntese proteica testados incluíram a gentamicina, cloranfenicol, rifampicina, clindamicina, e estreptomicina, que apresentaram 93,85%, 86,15%, 83,10%, 73,85% e 27,70% de sensibilidade, respectivamente.

Dentre as quinolonas, tem-se a ciprofloxacina que possui ótima atividade sobre *Pseudomonas* spp. (Reese et al., 2002). Constatou-se que 86,15% das cepas foram sensíveis a este antibiótico. O ácido nalidixico é outro representante das quinolonas. Um percentual de 89,3% dos isolados foram resistentes a este antibiótico. As

sulfonamidas são agentes quimioterápicos resultantes da inibição da via metabólica bacteriana dos folatos, o que interfere na replicação celular (CLSI, 2007). As sulfonamidas foram as primeiras drogas utilizadas com eficácia para tratar infecções humanas, mas segundo Reese et al. (2002) não deve ser a primeira escolha para tratamento de infecções por patógenos. Sua ação é melhor desde que aplicada em combinação com outro agente antibacteriano como a trimetropina. Provavelmente associado a estes fatos que 98,5% dos isolados foram resistentes à sulfonamida.

De uma forma geral, a incidência de cepas resistentes é maior em ambiente hospitalar. Essa diferença pode ser associada devido ao uso constante de drogas antimicrobianas para tratamento de infecções estafilocócicas no ambiente hospitalar comparado com a restrição do uso de antibióticos na indústria de alimentos.

Entretanto, mesmo que a maioria dos antimicrobianos testados tenha apresentado alta eficácia, deve-se atentar para o uso indiscriminado a fim de evitar a seleção de bactérias resistentes. Foram constatadas 23 (35,4%) cepas resistentes a quatro ou mais antimicrobianos simultaneamente.

Ressalta-se que dentre os 17 antimicrobianos testados, houve resistência simultânea em quatorze. Portanto, ressalta-se a necessidade do conhecimento do perfil de sensibilidade/resistência das bactérias que mais frequentemente são associadas a infecções e do modo de disseminação dessa resistência. Muitos alimentos, principalmente os diretamente manipulados são considerados potenciais fontes de origem de *Staphylococcus* spp., o que pode gerar casos ou surtos de intoxicações estafilocócicas e dificultar o tratamento dessas intoxicações.

CONCLUSÃO

Por todos esses aspectos, o isolamento e a caracterização de uma alta porcentagem de cepas do gênero *Staphylococcus* e da espécie *S. aureus* em todos os nichos avaliados neste trabalho, ressalta a importância do controle deste micro-organismo na indústria de carnes. Sendo, portanto, necessário a implementação e padronização de medidas de controle que incluem técnicas de higienização, treinamento e conscientização dos profissionais envolvidos na produção alimentos. Além disso, enfatiza-se a importância de rever melhorias para atualização da legislação brasileira em relação à pesquisa de estafilococos coagulase negativa.

REFERÊNCIAS

Ananou, S., Maqueda, M., Martínez-Bueno, M., Gálvez, A., & Valdivia, E. (2005). Control of *Staphylococcus aureus*

in sausages by enterocin AS-48. *Meat Science*, 71, 549–556. doi:10.1016/j.meatsci.2005.04.039

Andrade, N.J. (2008). *Higiene na indústria de alimentos: avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos*. São Paulo: Varela.

Anvisa. (2014). Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde. *Boletim Informativo*, 1, 1–12. doi:10.2307/3465735

Aye, R., Gautam, A., Reyaz, A., Vinson, H., & Ps, G. (2014). Evaluation of Selected Toxigenic Genes and Antimicrobial Agent Susceptibility in *Staphylococcus* Spp Isolated from Foods Purchased from North Dakota Grocery Stores. *Journal of Food & Nutritional Disorders*, 3(3), 1–5. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.4172/2324-9323.1000143>

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(4), 493-496.

Becker, K., Roth, R., & Peters, G. (1998). Rapid and specific detection of toxigenic *Staphylococcus aureus*: Use of two multiplex PCR enzyme immunoassays for amplification and hybridization of staphylococcal enterotoxin genes, exfoliative toxin genes, and toxic shock syndrome toxin 1 gene. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(9), 2548–2553. Retrieved from 0095-1137/98/\$04.0010

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Secretaria de Defesa Agropecuária, Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003. Aprova os métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água. *Diário Oficial da União*.

Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. *Diário Oficial da União*.

Chaibenjawong, P., & Foster, S. J. (2011). Desiccation tolerance in *Staphylococcus aureus*. *Archives of Microbiology*, 193, 125–135. doi:10.1007/s00203-010-0653-x

Cho, H., Uehara, T., & Bernhardt, T. G. (2014). Article Beta-Lactam Antibiotics Induce a Lethal Malfunctioning of the Bacterial Cell Wall Synthesis Machinery. *Cell*, 159(6), 1300–1311. doi:10.1016/j.cell.2014.11.017

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Performance Standard for Antimicrobial Susceptibility Testing*, Tables M100 - S17, 2007.

Cunha, M. D. L. R. D. S., Peresi, E., Oliveira Calsolari, R. A., & Araújo, J. P. (2006). Detection of enterotoxins genes in coagulase-negative staphylococci isolated from foods. *Brazilian Journal of Microbiology*, 37(1), 70–74. doi:10.1590/S1517-83822006000100013

Dinges, M. M., Orwin, P. M., & Schlievert, P. M. (2000). Exotoxins of *Staphylococcus aureus* Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology Reviews*,

13(1), 16–34. doi:10.1128/CMR.13.1.16-34.2000.Updated

FDA - US DEPARTMENT OF AGRICULTURE. (1996). *Food Safety and Inspection Service. Pathogen reduction: hazard analysis and critical point (HACCP) systems final rules*. Federal Register. Washington.

Ferreira, A. A., Tette, P. A. S., Mendonça, R. C. S., Soares, A. D. S., & Carvalho, M. M. (2014). Detection of exopolysaccharide production and biofilm-related genes in *Staphylococcus* spp. isolated from a poultry processing plant. *Food Science and Technology*, 34(4), 710–716. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1590/1678-457X.6446>

Fox, L.K.; Besser, T.E.; Jackson, S.M. (1996). Evaluation of a coagulase-negative variant of *Staphylococcus aureus* as a cause of intramammary infections in a herd of dairy cattle. *Veterinary Medical Associates*, 209, 1143-1146.

Guimaraes, F. D. F., Nobrega, D. B., Richini-Pereira, V. B., Marson, P. M., Pantoja, J. C. D. F., & Langoni, H. (2013). Enterotoxin genes in coagulase-negative and coagulase-positive staphylococci isolated from bovine milk. *Journal of Dairy Science*, 96(5), 2866–2872. doi:10.3168/jds.2012-5864

Jay, J.M. (2005). *Microbiologia de alimentos* (6ª ed.) Porto Alegre: Artmed.

Kérouanton, a., Hennekinne, J. a., Letertre, C., Petit, L., Chesneau, O., Brisabois, a., & De Buyser, M. L. (2007). Characterization of *Staphylococcus aureus* strains associated with food poisoning outbreaks in France. *International Journal of Food Microbiology*, 115(3), 369–375. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2006.10.050

Kumar, J. D., Negi, Y. K., Gaur, A., & Khanna, D. (2009). Detection of virulence genes in *Staphylococcus aureus* isolated from paper currency. *International Journal of Infectious Diseases*, 13(6), 450–455. doi:10.1016/j.ijid.2009.02.020

Lamaita, H. C., Cerqueira, M. M. O. ., Carmo, L. S., Santos, D. A., Penna, C. F. A. M., & Souza, M. R. (2005). *Staphylococcus* sp. counting and detection of staphylococcal enterotoxins and toxic shock toxin syndrome from cooled raw milk. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária E Zootecnia*, 57(5), 702–709.

Landeta, G., Curiel, J. a., Carrascosa, a. V., Muñoz, R., & de las Rivas, B. (2013). Characterization of coagulase-negative staphylococci isolated from Spanish dry cured meat products. *Meat Science*, 93(3), 387–396. doi:10.1016/j.meatsci.2012.09.019

Le Loir, Y., Baron, F., & Gautier, M. (2003). *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genetics and Molecular Research : GMR*, 2(1), 63–76. doi:S02 [pii]

Linage, B., Rodriguez-Calleja, J. M., Otero, A., Garcia-Lopez, M. L., & Santos, J. a. (2012). Characterization of coagulase-positive staphylococci isolated from tank and silo ewe milk. *Journal of Dairy Science*, 95(4), 1639–1644. doi:10.3168/jds.2011-4734

Martineau, F., Picard, F. J., Ke, D., Paradis, S., Roy, P. H., Ouellete, M., & Bergeron, M. G. (2001). Development of

a PCR Assay for Identification of Staphylococci at Genus and Species Levels Development of a PCR Assay for Identification of Staphylococci at Genus and Species Levels. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(7), 2541–2547. doi:10.1128/JCM.39.7.2541

Novick, R. P., Schlievert, P., & Ruzin, A. (2001). Pathogenicity and resistance islands of staphylococci. *Microbes and Infection*, 3(7), 585–594. doi:10.1016/S1286-4579(01)01414-9

Oliveira, A. M., Padovani, C. R., Nago, N. T., & Ana, A. S. S. (2011). 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*, 8(1), 159–163. Retrieved from 10.1089=fpd.2010.0590

Park, J. Y., Fox, L. K., Seo, K. S., McGuire, M. A., Park, Y. H., Rurangirwa, F. R., ... Bohach, G. A. (2011). Detection of classical and newly described staphylococcal superantigen genes in coagulase-negative staphylococci isolated from bovine intramammary infections. *Vet Microbiology*, 29(6), 997–1003. doi:10.1016/j.biotechadv.2011.08.021.Secreted

Pelisser, M. R., Klein, C. S., Ascoli, K. R., Zotti, T. R., & Arisi, A. C. M. (2009). Occurrence of *Staphylococcus aureus* and multiplex pcr detection of classic enterotoxin genes in cheese and meat products. *Brazilian Journal of Microbiology*, 40(1), 145–148. doi:10.1590/S1517-83822009000100025

Podkowik, M., Park, J. Y., Seo, K. S., Bystron, J., & Bania, J. (2013). Enterotoxigenic potential of coagulase-negative staphylococci. *International Journal of Food Microbiology*, 163, 34–40. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2013.02.005

Poli, a., Guglielmini, E., Sembeni, S., Spiazzi, M., Dellaglio, F., Rossi, F., & Torriani, S. (2007). Detection of *Staphylococcus aureus* and enterotoxin genotype diversity in Monte Veronese, a Protected Designation of Origin Italian cheese. *Letters in Applied Microbiology*, 45(5), 529–534. doi:10.1111/j.1472-765X.2007.02224.x

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. doi:10.1016/j.foodcont.2015.01.001

Reese, R.E.; Betts, R.F.; Gumustop, B. (2002). *Manual de antibióticos*(3ª ed). Tradução por Penildon Silva. Rio de Janeiro: Editora Médica e Científica.

Sandel, M.K.; McKillip, J.L. (2004). Virulence and recovery of *Staphylococcus aureus* relevant to the food industry using improvements on traditional approaches. *Food Control*, 15, 5–10.

Veras, J. F., do Carmo, L. S., Tong, L. C., Shupp, J. W., Cummings, C., dos Santos, D. A., Jett, M. (2008). A study of the enterotoxigenicity of coagulase-negative and coagulase-positive staphylococcal isolates from food poisoning outbreaks in Minas Gerais, Brazil. *International Journal of Infectious Diseases*, 12(4), 410–415. doi:10.1016/j.ijid.2007.09.018

Zell, C., Resch, M., Rosenstein, R., Albrecht, T., Hertel, C., & Götz, F. (2008). Characterization of toxin production of coagulase-negative staphylococci isolated from food and starter cultures. *International Journal of Food Microbiology*, 127(3), 246–251.
doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2008.07.016