

CLARISSE VIEIRA BOTELHO

***Staphylococcus coagulase positiva* E *Staphylococcus aureus* RESISTENTES A  
ANTIBIÓTICOS EM CADEIA PRODUTIVA DE CARNE SUÍNA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2017

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

B748s  
2017

Botelho, Clarisse Vieira, 1988-

*Staphylococcus coagulase positiva e Staphylococcus aureus*

resistentes a antibióticos em cadeia produtiva de carne suína /

Clarisse Vieira Botelho. – Viçosa, MG, 2017.

x, 87f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexo.

Orientador: Luís Augusto Nero.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Carne de porco. 2. Imunologia veterinária. 3.  
*Staphylococcus aureus*. 4. Antibióticos. 5. Resistência à drogas.  
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Veterinária.  
Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária. II. Título.

CDD 22 ed. 636.4

CLARISSE VIEIRA BOTELHO

*Staphylococcus* COAGULASE POSITIVA E *Staphylococcus aureus*  
RESISTENTES A ANTIBIÓTICOS EM CADEIA PRODUTIVA DE  
CARNE SUÍNA

Dissertação apresentada à Universidade Federal de  
Viçosa, como parte das exigências do Programa de  
Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para  
obtenção do título de *Magister Scientiarum*.

APROVADA: 13 de novembro de 2017.

  
Luciano dos Santos Bersot

  
Ricardo Seiti Yamatogi  
(Coorientador)

  
Luis Augusto Neto  
(Orientador)

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por sempre me guiar e iluminar todas as minhas escolhas.

À minha mãe, por ser sempre meu porto seguro e a quem devo tudo. Sem ela, nada seria possível.

Ao meu noivo Wagner, por me ajudar de todas as maneiras possíveis. Obrigada por todo o companheirismo e cumplicidade nesta e em todas as jornadas de minha vida.

Aos meus familiares e amigos por compreenderem minhas ausências e serem fundamentais nos momentos de descontração.

Ao meu orientador Prof. Luís Augusto Nero pelas orientações e conhecimentos transmitidos.

Ao Prof. Ricardo Seiti Yamatogi, meu co-orientador, por ser sempre tão acessível e disponível.

À equipe de pesquisadores da UFPR, sob coordenação do Prof. Luciano Bersot, pela parceria e troca de conhecimentos neste projeto em conjunto.

A cada um dos colegas do INSPOA, que de alguma maneira contribuíram para o desenvolvimento desse projeto e foram essenciais. Um agradecimento especial à Bruna, Juliana, Danilo e Frederico que dividiram comigo todas as alegrias e tristezas dos dias de preparo de material, coleta e processamento das amostras. À Emilene, por se fazer sempre presente, mesmo distante. Seus ensinamentos foram fundamentais. À Gabriela Nogueira, por me ensinar a microbiologia básica, com maestria e paciência.

À Universidade Federal de Viçosa por fornecer toda estrutura necessária ao desenvolvimento do projeto, ao CNPq pela concessão da bolsa e à FAPEMIG pelo financiamento do projeto.

À todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>v</b>
<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>vi</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>vii</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>ix</b>
<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>3</b>
1. A SUINOCULTURA NO BRASIL E NO MUNDO .....	3
2. A CADEIA PRODUTIVA DE CARNE SUÍNA .....	4
2.1. <i>Produção Primária de Carne Suína</i> .....	5
2.2. <i>Abate e Processamento</i> .....	7
3. <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> .....	11
3.1. <i>Características do gênero Staphylococcus e S. aureus</i> .....	11
3.2. <i>Epidemiologia e Disseminação na Cadeia Produtiva de Carne Suína</i> .....	13
4. RESISTÊNCIA À ANTIMICROBIANOS .....	16
4.1. <i>Mecanismos de Resistências aos Beta-lactâmicos</i> .....	22
4.2. <i>Mecanismos de Resistências à Vancomicina</i> .....	26
4.3. <i>Mecanismos de Resistências à Tetraciclina</i> .....	27
5. A SUINOCULTURA E O USO DE ANTIMICROBIANOS.....	28
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	32
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>41</b>
OBJETIVO GERAL .....	41
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	41
<b>ARTIGO: <i>Staphylococcus</i> COAGULASE POSITIVA E <i>Staphylococcus aureus</i> RESISTENTES A ANTIBIÓTICOS NA CADEIA PRODUTIVA DE CARNE SUÍNA .....</b>	<b>42</b>
RESUMO .....	43
ABSTRACT .....	44
1. INTRODUÇÃO .....	45
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	46
2.1. <i>Área de estudo e coleta de amostras</i> .....	46
2.2. <i>Enumeração de Staphylococcus coagulase positiva</i> .....	48

2.3. <i>Pesquisa de Staphylococcus aureus</i> .....	48
2.4. <i>Resistência a antimicrobianos</i> .....	51
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	53
3.1. <i>Enumeração de Staphylococcus coagulase positiva</i> .....	53
3.2. <i>Pesquisa de Staphylococcus aureus</i> .....	59
3.3. <i>Resistência a antimicrobianos</i> .....	61
4. CONCLUSÕES .....	72
AGRADECIMENTOS .....	73
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73
<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>78</b>
<b>ANEXO .....</b>	<b>79</b>

## LISTA DE FIGURAS

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1. Etapas do processo de abate, inspeção e processamento da carne suína. As figuras em verde indicam as etapas de inspeção, as em cinza indicam as instalações e em branco indicam as operações. Os asteriscos sinalizam os principais pontos de contaminação microbiológica ao longo de todo o processo. Fonte: PINTO, 2014 (adaptado)..... 8

### ARTIGO CIENTÍFICO

Figura 1. Representação esquemática de carcaça suína antes (A) e após (B) a separação durante o abate, com indicação dos locais amostrados com auxílio de esponjas estéreis em áreas delimitadas em 100 cm<sup>2</sup> (quadrados pontilhados).....47

Figura 2. Médias de contagens de *Staphylococcus* coagulase positiva ( $\pm$  erro padrão) em amostras obtidas em frigorífico de carne suína. I) Abate: A: carcaça após sangria, B: carcaça após chamuscamento, C: carcaça após evisceração, D: carcaça após lavagem; II) Ambiente de processamento: K-a: faca limpa, K-d: faca durante processamento, H-a: mãos limpas, H-d: mãos durante processamento, T-a: mesa limpa, T-d: mesa durante processamento; III) Produtos finais: Sausage: linguiça, Shoulder: paleta, Hump: pernil. Em cada gráfico: F: ANOVA, GL: graus de liberdade, p: nível de significância..... 58

## LISTA DE TABELAS

### ARTIGO CIENTÍFICO

- Tabela 1. Número de amostras, unidade amostral e pontos de amostragem da coleta na cadeia produtiva de carne suína na região de Viçosa, Minas Gerais, Brasil. ....47
- Tabela 2. Primers utilizados na PCR para identificação dos genes *femA*, *femB*, *blaZ*, *mecA*, *mecC*, *vanA* e *tetK*. ..... 50
- Tabela 3. Antimicrobianos e as concentrações utilizadas em ensaios de identificação de resistência por isolados de *Staphylococcus aureus* obtidos em cadeia produtiva de carne suína por meio da metodologia do breakpoint (BAE et al, 2005). ..... 52
- Tabela 4. Faixas de contaminação e frequência de *Staphylococcus* coagulase positiva (SCP) em amostras obtidas na cadeia produtiva de carne suína. .... 56
- Tabela 5. Frequência de resistência a diferentes antimicrobianos e presença de genes relacionados a resistência a diferentes antimicrobianos em isolados de *Staphylococcus aureus* (*femA* positivos) obtidos em diferentes etapas da cadeia produtiva de carne suína na região de Viçosa, Minas Gerais, Brasil. .... 62
- Tabela 6. Perfil de resistência a diferentes antimicrobianos por 246 isolados de *Staphylococcus aureus* obtidos da cadeia produtiva de carne suína. Resultados fenotípicos obtidos por teste de susceptibilidade considerando as concentrações indicadas para o breakpoint (CLSI, 2016)..... 65
- Tabela 7. Perfil genotípico por genes associados a resistência a diferentes antimicrobianos por 246 isolados de *Staphylococcus aureus* obtidos da cadeia produtiva de carne suína. .... 68
- Tabela 8. Comparação de resultados para identificação de resistência a antimicrobianos por métodos fenotípico e genotípico em 246 isolados de *Staphylococcus aureus* obtidos em cadeia produtiva de carne suína. .... 70

### ANEXO

- Tabela suplementar 1. Resultados fenotípicos obtidos pela metodologia de Concentração Mínima Inibitoria (MIC: Minimal Inhibitory Concentration) e pelo teste de susceptibilidade a concentração de breakpoint (Breakpoint) para identificação de resistência a diferentes antimicrobianos por *Staphylococcus aureus* obtidos de cadeia produtiva de carne suína..... 81
- Tabela suplementar 2. Coincidência de resultados fenotípicos obtidos pela metodologia de Concentração Mínima Inibitoria (MIC: Minimal Inhibitory Concentration) e pelo teste de susceptibilidade a concentração de breakpoint (Breakpoint) para identificação de resistência a diferentes antimicrobianos por *Staphylococcus aureus* obtidos de cadeia produtiva de carne suína..... 87

## RESUMO

BOTELHO, Clarisse Vieira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, novembro de 2017. ***Staphylococcus coagulase positiva* e *Staphylococcus aureus* resistentes a antibióticos em cadeia produtiva de carne suína.** Orientador: Luís Augusto Nero. Coorientador: Ricardo Seiti Yamatogi.

A cadeia produtiva de carne suína está susceptível a diferentes fontes de contaminação microbiológica em diferentes etapas, desde a produção primária até o processamento de produtos finais. Considerando o contexto atual de comércio internacional de produtos, o controle de eventuais perigos microbiológicos deve ser efetivo, visando a inocuidade dos produtos finais e segurança do consumidor. Em relação a carne suína, *Staphylococcus coagulase positiva* (SCP) possui grande importância por serem importantes indicadores das condições de manipulação, e também por indicarem a presença de *S. aureus*, que na cadeia produtiva de suínos possui relevância pela possibilidade de carrear genes de resistência a diferentes antimicrobianos nos produtos finais e consumidores. O objetivo desse estudo foi rastrear a contaminação por SCP e *S. aureus* resistentes a antimicrobianos na cadeia produtiva de carne suína. Duas granjas de criação de suínos (ciclo completo) e um frigorífico foram selecionados para coleta de 603 amostras ao longo da cadeia produtiva de carne suína (1 - Granjas: baia de terminação, n = 18; 2 - Abate: carcaça após sangria, n = 90; carcaça após chameamento, n = 90; carcaça após evisceração, n = 90; carcaça após lavagem, n = 90; 3 - Processamento: faca limpa, n = 27; faca durante processamento, n = 27; mãos limpas, n = 27; mãos durante processamento, n = 27; mesa limpa, n = 27; mesa durante processamento, n = 27; 4 - Produtos finais: costela, n = 18; paleta, n = 18; pernil, n = 18; linguiça, n = 9), que foram submetidas a enumeração de SCP, e posterior isolamento e identificação de *S. aureus*. A contaminação por SCP foi inferior a 2 log UFC/cm<sup>2</sup> ou g em 512 (84,9%) amostras, entre 2 e 3 logs UFC/cm<sup>2</sup> ou g em 52 (8,6%) amostras, entre 3 e 4 logs UFC/cm<sup>2</sup> ou g em 6 (1,0%) amostras, e superior a 4 log UFC/cm<sup>2</sup> ou g em 33 (5,5%) amostras. Contagens superiores a 4 log UFC/cm<sup>2</sup> ou g foram observadas em baias de terminação, carcaças após evisceração, carcaças após lavagem, facas limpas, mesas limpas, costela e linguiças. A enumeração de SCP foi possível em 197 (32,7%) amostras, e as contagens médias variaram entre 1,0 log UFC/cm<sup>2</sup> (mesa durante processamento) e 5,2 logs UFC/cm<sup>2</sup> (baia de terminação). Considerando as diferentes etapas de processamento, não foram observadas diferenças significativas entre as amostras obtidas no ambiente de processamento e nos produtos finais (p > 0,05). Durante o abate, as contagens médias de SCP obtidas nas carcaças após sangria foram

superiores quando comparadas as etapas posteriores ( $p > 0,05$ ). Um total de 315 colônias de SCP foi selecionado e caracterizado quanto ao perfil bioquímico e presença do gene *femA* para identificação de *S. aureus*. Assim, 246 isolados de *S. aureus* foram identificados e submetidos a caracterização de seus perfis de resistência em relação a 11 antimicrobianos, por testes de susceptibilidade e pela pesquisa de genes relacionados a resistência. Considerando os resultados fenotípicos, 90,7% dos isolados de *S. aureus* apresentaram resistência a sulfamethoxazole (SUL), 87,0% a ciprofloxacina (CIP), 67,9% a penicilina (PEN), 49,6% a eritromicina (ERI), 40,2% a oxacilina (OXA), 40,2% a clindamicina (CLI), 29,3% a rifampicina (RIF), 28,5% a cloranfenicol (CLO), 21,1% a tetraciclina (TET), 16,3% a vancomicina (VAN) e 6,5% a gentamicina (GEN). Apenas 15 isolados foram susceptíveis a todos os antimicrobianos testados (isolados obtidos de baias de terminação, carcaças, pernil e linguiça), 7 a apenas um antimicrobiano (CIP, SUL ou TET), e os demais resistentes simultaneamente a 2 a 10 diferentes antimicrobianos; o perfil de resistência a PEN-ERI-CIP-SUL foi o que apresentou maior frequência entre os isolados de *S. aureus* ( $n = 37$ ). Em relação aos genes relacionados a resistência a diferentes antimicrobianos, 74,0% dos isolados de *S. aureus* apresentaram resultados positivos para *blaZ* (PEN), 8,1% para *femB* (OXA), e 3,7% para *tetK* (TET); não foram observados resultados positivos para *vanA* (VAN), *mecA* e *mecC* (OXA). Entre os isolados de *S. aureus*, 60 não apresentaram nenhum dos genes pesquisados, 164 apresentaram apenas um dos genes isolados (*blaZ*, *femB* e *tetK*), 15 apresentaram simultaneamente os genes *femB-blaZ*, 4 os genes *blaZ-tetK*, e 3 os genes *femB-blaZ-tetK*. Apenas em relação a TET foi verificado que o teste de susceptibilidade foi equivalente a presença de *blaZ* ( $p = 0,147$ ), e ausência de equivalência de resultados para OXA (*femA*, *femB*), VAN (*vanA*) e TET (*tetK*) ( $p < 0,05$ ). Os resultados obtidos demonstram a relevância de SCP como indicadores de manipulação e higiene na cadeia produtiva de carne suína, assim como a presença de *S. aureus* com resistência a diferentes antimicrobianos, alertando para a necessidade de monitoramento por metodologias fenotípicas e moleculares.

## ABSTRACT

BOTELHO, Clarisse Vieira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, November, 2017. **Antibiotics resistance of coagulase positive *Staphylococcus* and *Staphylococcus aureus* in the pork production chain.** Advisor: Luís Augusto Nero. Co-advisor: Ricardo Seiti Yamatogi.

The pork production chain is susceptible to different sources of microbiological contamination at different stages, from primary production to the processing of final product. Regarding the current context of international trade in products, the control of possible microbiological hazards must be effective, aiming at the safety of final products and consumer. In relation to pork, *Staphylococcus coagulase* positive (SCP) is relevant because they are important indicators of the manipulation condition and also because they indicate the presence of *S. aureus*, which in the production chain of pigs has relevance due to the possibility of carrying resistance genes to different antimicrobials in the final products and consumers. The objective of this study was to track the contamination by SCP and *S. aureus* resistant to antimicrobial in the pork production chain. Two pig farms (complete cycle) and a refrigerator were selected to collect 603 samples through the pork production chain (1 - Farms: termination bay, n = 18; 2 - Slaughter: carcass after bleeding, n = 90; carcass after scorching, n = 90; carcass after evisceration, n = 90; carcass after washing, n = 90; 3 - Processing: clean knife, n = 27; knife during processing, n = 27; clean hands, n = 27; hands during processing, n = 27; clean table, n = 27; table during processing, n = 27; 4 - Final products: rib, n = 18; palette, n = 18; leg, n = 18; sausage, n = 9) which were submitted to SCP enumeration, subsequent isolation and identification of *S. aureus*. The SCP contamination was less than 2 log CFU / cm<sup>2</sup> or g in 512 (84.9%) samples, between 2 and 3 log CFU / cm<sup>2</sup> or g in 52 (8.6%) samples, between 3 and 4 CFU logs / cm<sup>2</sup> or g in 6 (1.0%) samples, and greater than 4 log CFU / cm<sup>2</sup> or g in 33 (5.5%) samples. Counts greater than 4 log CFU / cm<sup>2</sup> or g were observed in termination bins, carcasses after evisceration, carcasses after washing, clean knives, clean tables, rib and sausages. SCP enumeration was possible in 197 (32.7%) samples, and the mean counts varied between 1.0 log CFU / cm<sup>2</sup> (table during processing) and 5.2 log CFU / cm<sup>2</sup> (termination bay). Considering the different steps of the process, no significant differences were observed between the obtained samples in the processing environment and in the final products (p > 0.05). During slaughter, the SCP mean counts obtained on carcasses after bleeding were higher when compared to the later stages (p > 0.05). A total of 315 SCP colonies were selected and characterized in relation to the biochemical profile

and the presence of the *femA* gene for identification of *S. aureus*. Thus, 246 isolates of *S. aureus* were identified and submitted to characterization of their resistance profiles in relation to 11 antimicrobials, by susceptibility tests and by the search of genes related to resistance. Taking into account the phenotypic results, 90.7% of *S. aureus* isolates showed resistance to sulfamethoxazole (SUL), 87.0% to ciprofloxacin (CIP), 67.9% to penicillin (PEN), 49.6% to erythromycin (ERI), 40.2% to oxacillin (OXA), 40.2% to clindamycin (CLI), 29.3% to rifampicin (RIF), 28.5% to chloramphenicol (CLO), 21.1% to tetracycline (TET), 16.3% vancomycin (VAN) and 6.5% gentamycin (GEN). Only 15 isolates were susceptible to all antimicrobials tested (isolates obtained from finishing bays, carcasses, shanks and sausage), 7 to only one antimicrobial (CIP, SUL or TET), and the other resistant simultaneously to 2 to 10 different antimicrobials; the resistance profile to PEN-ERI-CIP-SUL was the most frequent among *S. aureus* isolates (n = 37). Regarding the genes related to resistance to different antimicrobials, 74.0% of *S. aureus* isolates presented positive results for *blaZ* (PEN), 8.1% for *femB* (OXA), and 3.7% for *tetK* (TET); no positive results were observed for *vanA* (VAN), *mecA* and *mecC* (OXA). Among the *S. aureus* isolates, 60 did not present any of the studied genes, 164 had only one of the isolated genes (*blaZ*, *femB* and *tetK*), 15 simultaneously presented the *femB-blaZ* genes, 4 the *blaZ-tetK* genes, and 3 *femB-blaZ-tetK* genes. Only in relation to TET, the susceptibility test was equivalent to the presence of *blaZ* ( $p = 0.147$ ), and no equivalence of results for OXA (*femA*, *femB*), VAN (*vanA*) and TET (*tetK*) ( $p < 0.05$ ). The results obtained demonstrate the relevance of SCP as indicators of handling and hygiene in the pork production chain, as well as the presence of *S. aureus* with resistance to different antimicrobials, highlighting the need for monitoring by phenotypic and molecular methodologies.

## INTRODUÇÃO

A carne suína é a principal fonte de proteína de origem animal produzida e consumida no mundo. Os sistemas intensivos de criação animal têm sido utilizados com a justificativa de que, desta forma, seja possível atender à crescente demanda por proteína animal. No entanto, o bem-estar animal e o meio ambiente ficam prejudicados, além de ocorrer uma maior disseminação de patógenos, o que exige um uso exagerado de medicações terapêuticas e profiláticas.

A busca pela crescente produtividade nesses sistemas de confinamento levou à rápida disseminação da prática de se utilizar antimicrobianos como aperfeiçoadores de desempenho e promotores de crescimento, o que culminou com o desenvolvimento de micro-organismos resistentes a essas substâncias. A resistência a antimicrobianos pode ser inerente a diversas espécies e gêneros bacterianos, mas pode ser desenvolvida e/ou adquirida por diferentes mecanismos.

O desenvolvimento da resistência a antimicrobianos é um dos grandes problemas atuais em Saúde Pública. O uso indiscriminado de agentes antimicrobianos, por pressão seletiva, leva à seleção de cepas resistentes. Antimicrobianos são amplamente utilizados na clínica médica, na produção dos animais, na indústria de alimentos, como conservadores, e nas pesquisas científicas.

A presença de micro-organismos resistentes a antimicrobianos determina perdas econômicas relevantes devido aos gastos com medicações ineficazes e, ademais, causa grandes prejuízos à Saúde Pública. Essa situação pode ser considerada ainda mais preocupante quando se considera o tempo necessário para se desenvolver um novo antimicrobiano *versus* o desenvolvimento da resistência, que acontece de forma bem mais rápida.

Com o advento do Acordo Sanitário e Fito-Sanitário (Sanitary and Phyto-Sanitary Agreement), a partir de 1995, os países signatários da Organização Mundial de

Comércio (OMC) concordaram em estabelecer critérios baseados principalmente na segurança dos alimentos destinados ao comércio internacional, evidenciando a necessidade de um controle adequado da contaminação, assim como a identificação de focos de contaminação de diferentes micro-organismos patogênicos em diferentes cadeias produtivas de alimentos. O conceito de segurança alimentar engloba, dentre outros pontos, a produção de alimentos isentos de qualquer resíduo de antimicrobianos, uma vez que considera a inocuidade microbiológica e químicas dos mesmos.

Nesse contexto, a cadeia produtiva da carne suína, baseada na criação intensiva, possui destaque pelas suas características de produção que favorecem o desenvolvimento de micro-organismos patogênicos. Os animais, os trabalhadores, o ambiente, os equipamentos e os utensílios podem ser fontes de contaminação, sendo fundamental o monitoramento de todas as etapas para a produção de um alimento inócuo e seguro.

Entre os patógenos associados à cadeia produtiva de carne suína, *Staphylococcus aureus* merece destaque, principalmente quando se considera a resistência a antimicrobianos como uma questão de Saúde Pública e o fato de humanos e suínos serem portadores assintomáticos dessa espécie bacteriana, se configurando veículos de contaminação da carne suína. O presente trabalho teve como objetivo principal rastrear a contaminação de toda a cadeia produtiva de carne suína por *S. coagulans* positiva e *S. aureus* resistentes a antimicrobianos.

## REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1. A Suinocultura no Brasil e no Mundo

A carne suína é o tipo de carne mais consumido no mundo, embora possua restrições em alguns locais devido às questões religiosas e hábitos alimentares (GERVASIO, 2013). Atualmente, sabe-se que a carne suína não é prejudicial à saúde, além de ser uma carne magra e tão nutritiva quanto aos demais tipos de carnes (ABPA, 2015; VALLE, 2000).

Segundo o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA, 2014), a carne suína é a principal fonte de proteína animal para consumo humano, representando 42,9% do consumo total de carne em 2016, contra 34,6% e 22,5% de carne de aves e bovina. No Brasil, o consumo da carne suína é relevante, mas as carnes bovina e de frango possuem maior demanda. De acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), o consumo per capita de carne suína no Brasil em 2014 foi de 14,71 kg, e permaneceu na terceira colocação entre os principais produtos cárneos (carne de frango = 43,24 kg/hab; carne bovina = 41,26 kg/hab) (ABPA, 2015). Considerando os dados da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), a quantidade de produtos oferecidos ao consumidor vem crescendo nos últimos anos, sendo que a disponibilidade de carne suína em 2013 foi estimada em 15,1 kg per capita, aumento de mais de 15% em relação a 2008 (CONAB, 2013).

Em termos gerais, a China é o principal produtor de suínos, tendo apresentado índices de crescimento na ordem de 11,23% no período de 1998-2002. No Brasil, a produção desse tipo de carne vem apresentando índices consideráveis de crescimento nos últimos 22 anos (ABCS, 2014). Segundo indicadores do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2014), o Brasil abateu 35.979.434 milhões de suínos em 2012,

continuando como o quarto maior produtor mundial de carne suína, atrás apenas da China, União Europeia e Estados Unidos da América (EUA). A produção nacional em 2013 foi da ordem de 3,3 milhões de toneladas equivalente-carcaças, contra uma produção chinesa de 54,9 milhões de toneladas. Neste mesmo ano a produção da União Europeia foi de 22,3 milhões de toneladas e a dos EUA de 10,5 (USDA, 2014). Atualmente, o Brasil é o quarto maior exportador mundial de carne suína, perdendo apenas para EUA, União Europeia e Canadá. Em 2013, O Brasil embarcou 585 mil toneladas de carne suína (USDA, 2014).

Internamente, o Estado do Paraná é o terceiro maior produtor nacional, sendo Santa Catarina e Rio Grande do Sul os dois primeiros. O Paraná tem rebanho de 6.988.685 animais, e Minas Gerais, em quarto lugar no “ranking” brasileiro, possui 4.425.178 animais. A produção de carne suína no Brasil está concentrada em poucos estados: em 2012, Santa Catarina, Rio Grande do Sul, Paraná e Minas Gerais foram responsáveis por 63% da produção nacional (IBGE, 2015). Em Minas Gerais, as regiões que mais produzem suínos são as microrregiões de Uberlândia e Ponte Nova.

## **2. A cadeia Produtiva de Carne Suína**

A cadeia produtiva de carne suína é composta por 3 macrosssegmentos: produção de matérias-primas, industrialização e comercialização (BATALHA & SILVA, 2007). Esses 3 macrosssegmentos são compostos por 5 subsistemas.

O primeiro macrosssegmento pode ser dividido em 2 subsistemas: apoio e produção agropecuária. O apoio é composto pelos fornecedores de insumos básicos e agentes transportadores. Já a produção da matéria-prima é formada por empresas rurais que geram, criam e engordam os animais com o objetivo de atender o próximo elo da

cadeia: as indústrias de primeira transformação. Toda a produção agropecuária pode ser integrada em um único local ou subdividida em diversos empreendimentos.

A industrialização, que corresponde ao terceiro subsistema, é dividida em 2 tipos: indústrias de primeira transformação e indústrias de segunda transformação. Estas indústrias são responsáveis pelo abate e processamento, sendo a primeira geradora de carne *in natura* e a segunda responsável pela incorporação da carne suína a produtos mais elaborados, de modo a agregar valor a carne.

O quarto subsistema é a comercialização, que engloba a distribuição dos produtos e derivados desde o frigorífico até a mesa do consumidor final. Fazem parte deste elo atacadistas, exportadores, varejistas, empresas de alimentação coletiva, restaurantes, hotéis, escolas e demais empresas que utilizam a carne como produto facilitador.

O consumo é considerado o último subsistema da cadeia produtiva de carne suína, sendo composto pelos consumidores finais, que adquirem, preparam e se alimentam do produto final. Esses setores são os responsáveis por definir as características desejadas dos produtos, influenciando todos os outros agentes da cadeia produtiva.

### **2.1. Produção Primária de Carne Suína**

A criação de suínos, basicamente, pode ser de 2 tipos: intensiva ou extensiva. O sistema de criação intensivo pode ser de 3 tipos: sistema intensivo semi-confinado, confinado ou ao ar livre (ABCS, 2014). No semi-confinamento machos, fêmeas vazias e gestantes ficam em piquetes enquanto fêmeas lactantes e leitões ficam confinados. Os animais que seguirão para o abate também ficam confinados. Já no confinamento, animais de todas as fases ficam confinados, o que demanda uma menor área de produção. Este

tipo de criação objetiva produtividade e economia. No sistema ao ar livre, também chamado de SISCAL, todos os animais ficam em piquetes, com declive, sombreamento e cabanas adequadas. No sistema extensivo, os animais ficam soltos em instalações rústicas sem qualquer separação.

O sistema de confinamento, no qual os animais ficam confinados em todas as fases da produção, é o principal sistema de criação das regiões Sul e Sudeste, sendo que os tipos de produção podem ser divididos em “sistema de ciclo completo” e “sistema com múltiplos locais”. No primeiro caso, as propriedades detêm todo o processo de produção, desde a recepção do material genético até a entrega dos suínos em idade de abate para os frigoríficos, como ocorre tipicamente no estado de Minas Gerais. No sistema de múltiplos locais, existem basicamente duas unidades produtivas envolvidas: a Unidade Produtora de Leitões (UPL) e a Unidade de Terminação (UT), predominante na região Sul do Brasil (AMARAL et al., 2006). A UPL é responsável pela inseminação, maternidade, desmame e creche. Os leitões ficam nesta unidade até alcançarem entre 22 kg e 28 kg. Da UPL os leitões passam para as UT's, onde são engordados até atingirem um peso de abate, entre 100 e 130 kg, quando então seguem para o abatedouro.

O sistema intensivo de criação é um dos responsáveis pelo aumento da produtividade na suinocultura, gerando carne suficiente para suprir a demanda mundial. Entretanto, esse sistema apresenta alguns inconvenientes, especialmente relacionados ao comportamento, ao bem-estar animal, à poluição ambiental e à disseminação de patógenos (D'SILVA, 2000).

Em relação a patógenos, a criação intensiva não determina necessariamente a infecção dos animais; porém, ocorre uma predisposição natural dos animais em carrear tais patógenos, principalmente os de origem entérica, que podem ser disseminados no ambiente de abate e processamento de carne suína. A preocupação em se controlar tais contaminações é fundamental, devido ao expressivo consumo de carne suína e às

exigências de exportação. O comércio internacional é muito competitivo e exige carne de alta qualidade. Para se manter no mercado exportador é necessário um grande controle sanitário de todas as etapas de produção. Ainda, a carne suína, frequentemente, é associada a surtos alimentares em humanos, principalmente em função da contaminação por *Salmonella* spp. (CÊ, 2016). Todas essas questões demandam um controle microbiológico bem criterioso da carne suína.

Além de *Salmonella* spp., diversos outros patógenos acometem a cadeia produtiva de carne suína. *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica* e *Campylobacter* spp. são os patógenos mais prevalentes, além de *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum* e *Mycobacterium* spp., conforme Fosse et al. (2008). *Staphylococcus aureus* também é um micro-organismo de importância na cadeia de carne suína; trata-se de um micro-organismo comensal em suínos e humanos, e capaz de causar severas toxinfecções alimentares devido a produção de enterotoxinas e ainda, importante carreador de genes de resistência a antimicrobianos para outros micro-organismos.

## **2.2. Abate e Processamento**

O abate consiste de etapas que vão desde a insensibilização até o resfriamento da carcaça. O abate é dividido em área suja e área limpa, sendo que a primeira engloba a insensibilização, sangria, escaldamento/depilação e toailete. A área limpa é composta pela oclusão do reto, evisceração, divisão da carcaça em duas meia-carcaças, inspeção, toailete, lavagem final e resfriamento. A Figura 1 representa, de forma esquematizada, o fluxograma de abate, inspeção e processamento da carne suína.

As etapas de abate e processamento da carne suína envolvem operações complexas realizadas em sequência que influenciam diretamente na qualidade do produto final. Há inúmeros riscos de contaminação por bactérias patogênicas e deteriorantes

dentro da planta frigorífica. Algumas etapas tem o objetivo de reduzir a carga microbiana. No entanto, nenhuma é capaz de eliminar, por completo, a contaminação microbiana, caso haja (LIMA et al,2004).

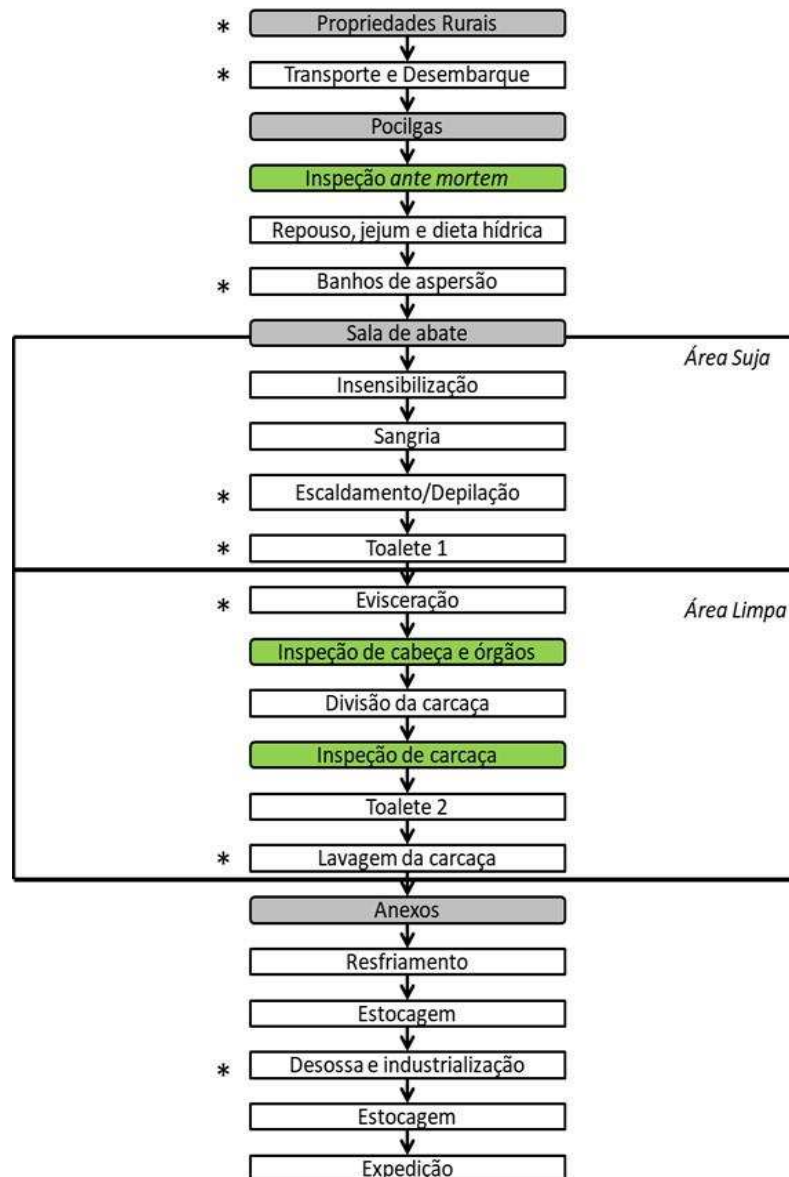


Figura 1. Etapas do processo de abate, inspeção e processamento da carne suína. As figuras em verde indicam as etapas de inspeção, as em cinza indicam as instalações e em branco indicam as operações. Os asteriscos sinalizam os principais pontos de contaminação microbiana ao longo de todo o processo. Fonte: PINTO, 2014 (adaptado).

De um modo geral, o tecido muscular dos suínos, até o momento do abate e processamento, está isento das bactérias típicas da cadeia produtiva (ALGINO et al., 2009). Porém, ao longo da linha de abate pode ocorrer contaminações oriundas da pele,

fezes, vísceras e pés dos animais, dos equipamentos, utensílios e manipuladores. Conforme Choi et al. (2013), as principais fontes de contaminação são a pele dos animais, água utilizada, equipamentos e utensílios. Os humanos e os próprios suínos são fontes de infecção, assim como seus produtos e subprodutos também são importantes veículos de transmissão. Os animais e os operários são os responsáveis por carregarem micro-organismos para dentro da planta frigorífica (LIMA et al., 2004).

*S. aureus* e *Salmonella* spp., estão entre os principais perigos do consumo de carne para a Saúde Pública e circulam na planta de abate de suínos advindo dos funcionários e dos animais sem serem detectados pelo Serviço de Inspeção, uma vez que indivíduos e animais sadios são portadores e reservatórios desses patógenos (PINTO, 2014). Sem dúvida, a evisceração é a principal responsável pela disseminação de bactérias entéricas na linha de abate (DELHALLE et al, 2008). Por ser um ponto crítico de controle, imediatamente após essa etapa encontra-se um ponto de verificação do sistema de inspeção.

Como já apresentado anteriormente, dentro da linha de abate há inúmeros pontos críticos que podem levar à disseminação de micro-organismos. *S. aureus* vem sendo isolado sobretudo de etapas que envolvem intensa manipulação da carcaça ou da carne, como, por exemplo, a toailete e após a evisceração, que é feita de forma manual. Esta espécie tem sido encontrada em carcaça de suínos em concentrações que variam entre  $10^1$  e  $10^6$  UFC/cm<sup>2</sup>, conforme Pinto (2014). *S. aureus* pode permanecer por longos períodos no ambiente de abate, por meio da formação de biofilmes. No entanto, são fracos competidores, tendo seu desenvolvimento inibido pela presença de outras bactérias. *Staphylococcus* coagulase positivo já foram isolados até de etapas como escaldagem, chamuscamento e refrigeração (SPESCHA et al., 2006). Tenhagen et al. (2009) isolaram *Staphylococcus* spp. de swabs nasais de suínos após a insensibilização.

Neste sentido, é importante salientar que a produção de alimentos inócuos só ocorre se todos os elos da cadeia produtiva estiverem envolvidos (base do conceito denominado “from farm to fork”); todas as etapas da cadeia produtiva dos alimentos devem ser monitoradas pelas diversas ferramentas disponíveis atualmente, a fim de permitir um controle adequado da contaminação para que o objetivo final de inocuidade seja atingido. Assim, na produção primária devem ser tomadas as primeiras medidas para minimizar a contaminação pelos possíveis patógenos presentes na cadeia produtiva da carne suína, formando-se a “primeira linha de defesa” necessária para prevenir e controlar os perigos de origem biológica, dando origem, conseqüentemente, a uma matéria prima de melhor qualidade higiênico-sanitária (KAFERSTEIN, 2003).

O conceito “from farm to fork” (“da fazenda ao garfo”) foi criado em 2004 pela Comunidade Europeia com o objetivo de garantir a qualidade e inocuidade dos alimentos pelo monitoramento em diferentes etapas da cadeia produtiva, desde a produção dos animais até a ingestão pelo consumidor, sendo que todas as etapas são passíveis de rastreamento. Segundo este conceito, o consumidor precisa ter conhecimento de todos os perigos e riscos inerentes àquele alimento (EUROPEAN COMMISSION, 2004).

O monitoramento de toda a cadeia produtiva é essencial para identificar as fontes de contaminação e determinar medidas corretivas de modo a garantir a produção de um produto final seguro e inócuo. A carne suína pode ser contaminada por diferentes patógenos e os alimentos são uma importante via de transferência dessa resistência. Alimentos contaminados com bactérias resistentes podem, no intestino do hospedeiro, transferir a resistência para bactérias patogênicas, não patogênicas e oportunistas (SØRUM & L'ABÉE-LUND, 2002).

A fim de se alcançar essa qualidade microbiológica, diferentes ferramentas de controle da qualidade são implementadas nas plantas frigoríficas. O sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) é mundialmente conhecido e

reconhecido. Por meio de uma árvore decisória, base para o APPCC, são identificados os perigos e pontos críticos que demandam controle. Após este levantamento, são estabelecidos critérios e limites críticos aceitáveis e então ocorre o monitoramento, verificação, correção de possíveis falhas e registro de todo o processo.

O APPCC, juntamente com as Boas Práticas de Fabricação e Procedimentos Padrão de Higiene Operacional (PPHO) fazem parte dos Programas de Autocontrole (PAC), exigido às indústrias produtoras de alimentos. Os órgãos fiscalizadores são responsáveis pela verificação da implantação e execução do PAC, cujo objetivo é garantir a qualidade higiênico-sanitária dos alimentos produzidos (BRASIL, 2017).

### **3. *Staphylococcus aureus***

A contaminação da carne suína por *S. aureus* é importante quando se leva em consideração a grande capacidade que esse micro-organismo possui em adquirir resistência a inúmeros antimicrobianos; essa resistência pode ser transferida de maneira horizontal, entre bactérias do mesmo gênero, e, de modo vertical, entre bactérias de diferentes gêneros. O consumo de uma carne suína contaminada por *S. aureus* resistente, pode transmitir ao homem esses elementos de resistência.

A colonização e infecção por cepas resistentes pode levar à contaminação de produtos cárneos destinados ao consumo humano. Estudos já isolaram *S. aureus* resistentes a metilina (MRSA) de alimentos de origem animal, incluindo carne suína, bovina e de frango, além de queijo, leite e outros derivados (DE BOER et al.,2009).

#### **3.1. *Características do gênero Staphylococcus e S. aureus***

O gênero *Staphylococcus* é composto por bactérias Gram positivas com formato de cocos e diâmetro entre 0,5 e 1,5  $\mu\text{m}$ , catalase positivos, imóveis, não esporulados, aeróbios ou anaeróbios facultativos (HERMANS, 2008). Este micro-organismo pode apresentar diferentes formatos de agrupamentos: isolados, aos pares, em cadeias curtas ou agrupados de forma irregular, semelhante a um cacho de uva. Este gênero foi isolado e descrito pela primeira vez em 1878 por Robert Koch, que isolou a bactéria de uma ferida purulenta.

O gênero *Staphylococcus* pertence à família Staphylococcaceae, ordem Bacillales, classe Bacilli e filo Firmicutes. Segundo Euzéby (2012), este gênero é composto por 47 espécies e 24 subespécies, subdivididos em dois grupos conforme sua capacidade de produzir a enzima coagulase. A espécie *S. aureus* foi assim denominada por Rosenbach, em 1884, em função da produção de pigmento cor de ouro, característica que pode ser perdida durante sucessivos subcultivos.

As espécies coagulase positivas são *S. aureus* subsp. *aureus*, *S. aureus* subsp. *anaerobius*, *S. hyicus*, *S. lutrae*, *S. intermedius*, *S. pseudintermedius*, *S. schleiferi* subsp. *coagulans* e *S. delphini*. Todas as demais espécies são coagulase negativas (Hermans et al., 2008). De acordo com Gomes (2013), *Staphylococcus* spp. estão entre os micro-organismos não esporulados mais resistentes: resistem à dessecação, ao calor e são mais tolerantes aos desinfetantes comuns do que a maioria das bactérias. *Staphylococcus* spp. estão presentes nos mais diversos ambientes e são considerados simbioses uma vez que compõem a microbiota da pele e do trato respiratório de diversas espécies animais.

De maneira geral, *S. aureus* são micro-organismos mesófilos com temperatura ótima de multiplicação entre 35 e 37°C, podendo se multiplicar em uma faixa de temperatura entre 6 e 48°C. São capazes de se desenvolver em uma ampla faixa de pH, sendo pH entre 7,0 e 7,5 ótimos para multiplicação. Outra característica diferencial desta

bactéria é o fato de serem halotolerantes, sobrevivendo em ambientes com até 10% de NaCl.

Dentre as espécies de *Staphylococcus*, *S. aureus* é a mais importante em função da sua capacidade de adquirir resistência a antimicrobianos e da sua patogenicidade, sendo a espécie mais relacionada a surtos de intoxicação alimentar (DE BUYSER et al., 2001). Outro fator que torna *S. aureus* uma espécie de importância, é a capacidade de formarem biofilmes compostos por multicamadas de células e resistirem a dessecação, podendo permanecer em superfícies, utensílios e equipamentos, o que constitui outra importante fonte de contaminação (BERGDOLL & WONG 2006).

### **3.2. Epidemiologia e Disseminação na Cadeia Produtiva de Carne Suína**

A maioria dos animais domésticos abriga *S. aureus*, bactéria que apresenta natureza ubíqua, estando presente na pele e mucosa, especialmente na região nasofaríngea de mamíferos e aves. *S. aureus* é um patógeno que causa enfermidades em humanos e animais. Quando *S. aureus* consegue invadir o hospedeiro, é capaz de causar uma série de infecções cutâneas, mas também outras infecções invasivas (PANTOSTI, 2012).

Essa ampla distribuição faz com que *S. aureus* esteja presente em animais de todas as idades. Ainda, *S. aureus* já foi isolado de fezes, alimentos, água, piso e paredes de baias, aerossóis, articulações, pele, cavidade oronasal, traqueia, prepúcio, vagina, intestino (TAYLOR, 1999; LEE, 2003). Por ser ubíquo e facilmente transferido aos alimentos por manipuladores, *S. aureus* é considerado um importante indicador de higiene pessoal e de qualidade dos alimentos. Le Loir et al. (2003) estimam que 20 a 50% dos seres humanos adultos sejam portadores assintomáticos de *S. aureus*, tornando-se importantes veículos de contaminação de alimentos.

Em humanos, este micro-organismo é um patógeno oportunista que causa diferentes enfermidades, que variam desde infecções superficiais na pele a osteomielite, pneumonia, artrite séptica e síndrome do choque tóxico (LUONG et al., 2006). Bactérias do gênero *Staphylococcus* são as principais causadoras de infecções hospitalares (CDC, 1997), sendo *S. aureus* um dos principais patógenos do gênero em virtude da sua capacidade de colonizar inúmeras espécies e ser muito resistente, mesmo em ambientes inadequados ao seu desenvolvimento.

Nos animais, *S. aureus* pode causar mastites, lesões supurativas em bovinos, piodermites, lesões de pele e artrite em aves, infecções urinárias em cães e em suínos pode causar lesões supurativas. Em suínos, *S. aureus* é uma importante causa de infecções, sendo responsável por prejuízos econômicos na agropecuária. Em função disso, é prática comum, o uso de antimicrobianos com fins terapêuticos e profiláticos, mas também como estimuladores de crescimento.

Inicialmente, as cepas de *S. aureus* resistentes a metilina, conhecidos como MRSA, eram uma preocupação apenas em ambientes hospitalares. Hoje já se sabe que estes micro-organismos estão presentes em diversas espécies animais. MRSA, hoje, é um colonizador frequente de populações animais, possivelmente em função do uso indiscriminado de antimicrobianos na pecuária. Já foi descrito um MRSA associado à pecuária, conhecido como LA-MRSA, frequente em suínos e bovinos (PANTOSTI, 2012). A descoberta de MRSA em animais tornou a pecuária um motivo de grande preocupação para a Saúde Pública, uma vez que se revelou um importante reservatório de bactérias resistentes a antimicrobianos. A criação animal permite uma maior proximidade entre homens e os animais, o que facilita a transmissão de doenças e determina a utilização de antimicrobianos; essa situação favorece o aparecimento de novos patógenos e micro-organismos resistentes a essas substâncias. Ainda, os alimentos

de origem animal podem ser veículos de propagação, principalmente quando se pensa em um mercado globalizado (PANTOSTI, 2012).

Weese et al. (2006) descreveram MRSA em cães e gatos, cuja transmissão ocorreu entre os animais, dos animais para humanos e dos humanos para os animais. Busscher et al. (2006) isolaram *Staphylococcus* coagulase negativa resistentes à meticilina de cavalos e dos veterinários que lidavam com esses animais. Em 2005, em Cingapura, MRSA foi inesperadamente isolado de um suíno usado para pesquisa de diabetes em um hospital (SERGIO et al., 2007). Na Alemanha, um estudo envolvendo carne fresca de frango e peru e produtos à base de frango, isolou amostras de MRSA desses alimentos. (FEBLER et al, 2011).

Voss et al. (2005), em estudo na Holanda em 2004 e 2005, isolaram MRSA de um bebê que não tinha histórico de viagem ou admissão em hospitais. Após subseqüentes infecções, eles descobriram que os pais eram positivos para MRSA e eram criadores de suínos. Ainda dentro do mesmo estudo, os pesquisadores identificaram outros 2 novos casos de MRSA em um criador de porcos e em um filho de um veterinário que trabalhava com suínos. Ainda, a mesma estirpe isolada do veterinário e de seu filho foi encontrada em uma enfermeira na unidade hospitalar em que o filho foi admitido.

Em outro estudo, também na Holanda, com 540 suínos saudáveis, 39% dos animais possuíam MRSA. A possível fonte do gene *mecA* são *Staphylococcus* coagulase negativa que compõe a microbiota de suínos, o contato com outras espécies animais infectadas ou mesmo alimentos e poeira (DE NEELING et al.,2007).

Em um estudo realizado pela Agência Europeia de Segurança Alimentar (EFSA), em 2008, do qual 24 países participaram, foi avaliado a existência de MRSA na poeira de ambientes de granjas de suínos. A presença de MRSA na poeira foi considerada indicativa de colonização dos suínos. Criações com altas densidades de animais apresentaram maiores frequências de MRSA (PANTOSTI, 2012).

Outros estudos na Holanda, entre 2007 e 2008, com 202 rebanhos de suínos, a prevalência de rebanhos positivos para MRSA foi de 67% em rebanhos de recria e de 71% em rebanhos de terminação (BROENS et al.,2011). Observou-se que o número de MRSA positivos aumentou de 30% para 75% do início para o final do estudo, o que sugere que houve uma transmissão entre os rebanhos. Ainda, a prevalência foi maior em rebanhos maiores (BROENS et al.,2011).

Na Alemanha, Meemkem (2010) isolou 138 cepas de *S. aureus* de lesões de necrópsia de suínos, sendo que destes 60 foram caracterizados com MRSA, e o SCCmec, elemento genético móvel, foi detectado em 50% dos isolados de pulmão, articulação e pele.

Diversos estudos têm apontado a presença de MRSA em produtos cárneos. Uma pesquisa feita no distrito de Vhembe, na África do Sul, observou uma prevalência de 32,5% de *S. aureus* isolados de esfregaços de carcaças de suínos, dos quais 100% foram resistentes à oxacilina e ácido nalidíxico, de um total de 176 amostras de swabs (TANIH et al., 2015).

Van Cleef (2010), em seu estudo na Holanda, evidenciou a presença de MRSA na cavidade nasal de funcionários da área de pré-abate, baias de espera, insensibilização, sangria, escaldagem, depilagem, chamuscamento de matadouros de suínos e em funcionários responsáveis pelo descarregamento e transporte dos animais.

Lee (2003), na Coreia do Sul, isolou MRSA de 39 amostras de carne suína de um total de 161. Entre 2009 e 2010, houve na Suíça um aumento significativo de isolados MRSA em frigoríficos, segundo Overesch et al (2011).

#### **4. Resistência à Antimicrobianos**

A resistência a agentes físicos e químicos entre os micro-organismos é conhecida desde o início da era microbiana. Fleming, em 1929, ao descobrir a penicilina, já observou a existência de resistência natural de micro-organismos a essa substância (ABRAHAM & CHAIN, 1988).

Algumas espécies apresentam resistência variável em função do país, região, e origem das estirpes (hospitalares ou comunitárias). *S. aureus* é uma espécie que apresenta resistência difundida em todo o mundo e tem a capacidade de desenvolver resistência a praticamente todos os antimicrobianos de uso clínico (PANTOSTI et al., 2007).

Desde a década de 1960, micro-organismos resistentes a antibióticos têm sido descritos como relevantes para saúde humana devido à dificuldade de tratamentos. Dentre estes, *S. aureus* vem se destacando pela sua importância em infecções hospitalares e infecções nosocomiais. Diante disso, estirpes de *S. aureus* resistentes a antimicrobianos ganham destaque, uma vez que são resistentes às principais drogas utilizadas na medicina humana e veterinária (MASSON, 2012).

A primeira evidência de *S. aureus* resistente a penicilina apareceu em 1941, dois anos após a introdução desta droga na terapia clínica. Em 1980, 90% dos *S. aureus* isolados de humanos já foram descritos como resistentes à penicilina. A resistência a este antimicrobiano é conferida por um gene plasmidial, o que provoca uma rápida difusão da resistência entre as bactérias (PESAVENTO et al., 2007). A introdução da meticilina na prática médica, como alternativa à resistência à penicilina em 1960, levou ao desenvolvimento de cepas resistentes à meticilina (MRSA), linhagens que não respondem ao tratamento com antibióticos beta-lactâmicos, já em 1961. Como consequência, a vancomicina tornou-se uma alternativa de tratamento, porém determinou o desenvolvimento de cepas resistentes já em 1996 (BASSANI, 2009), onde o professor Keich Hiramatsu, da Universidade de Jutendo, Japão, isolou uma cepa de uma ferida cirúrgica resistente à Vancomicina. No ano 2000, foram encontradas as primeiras cepas

resistentes a este glicopeptídeo no Brasil, em um hospital do município de Queimados, no Estado do Rio de Janeiro (SANTOS et al, 2007).

A disseminação de cepas resistentes a antimicrobianos é uma preocupação mundial, e nesse contexto *S. aureus* resistentes a meticilina possui um grande destaque (APPELBAUM, 2007). Por muitos anos, estas cepas foram exclusivas de hospitais, mas atualmente já é conhecida sua disseminação em alimentos e em animais de companhia.

O uso indiscriminado de antimicrobianos é um dos responsáveis pelo aparecimento de resistência na população bacteriana. Este problema é ainda agravado pelo fato de se utilizar os mesmos antimicrobianos na terapêutica de humanos e animais. Inicialmente, infecções causadas por cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina eram associadas apenas a ambientes hospitalares. No entanto, este problema ultrapassou os limites hospitalares, estendendo-se a toda comunidade e aos animais. A resistência aos antimicrobianos é um grande problema na produção animal, que acarreta inúmeros prejuízos à Saúde Pública.

Os produtos de origem animal têm grande importância na questão da resistência, uma vez que a ingestão desses produtos contaminados com micro-organismos resistentes pode transferir resistência para outros micro-organismos que acometem humanos, dificultando o tratamento de doenças infecciosas por terapias tradicionais que utilizam antimicrobianos.

Produtos cárneos são vetores de transferência da resistência antimicrobiana, que pode ocorrer de 3 maneiras distintas: por meio de resíduo de antibiótico em alimentos, por patógenos resistentes presentes nos alimentos ou pela transferência de resistência entre micro-organismos. Assim, é importante a identificação das diferentes origens de contaminação de cepas resistentes ao longo da cadeia produtiva desses alimentos, permitindo um controle adequado e redução da disseminação de cepas resistentes no ambiente industrial, com consequente contaminação de produtos cárneos finais.

A resistência pode ser adquirida, ou seja, ocorrer em micro-organismos que são originalmente sensíveis a determinados antimicrobianos, mas que devido à mutação genética tornam-se resistentes.

Outra forma de resistência é a transferível, que pode ocorrer por transdução, transformação e conjugação, através dos quais ocorre transferência de material genético de um micro-organismo resistente a um micro-organismo sensível. Por este mecanismo de resistência cruzada, há transferência de estruturas externas ao código bacteriano, que conferem resistência a um ou mais antimicrobiano e geralmente envolvem genes situados nos plasmídios e transposons (TAVARES, 1990).

Os dois principais fatores envolvidos no desenvolvimento da resistência aos antimicrobianos em bactérias são a pressão seletiva e a presença de genes de resistência (WITTE, 2000). O DNA plasmidial é menos estável que o DNA cromossômico, sendo facilmente transportado de uma linhagem a outra por meio de conjugação bacteriana, permitindo uma transferência de genes em conjunto incluindo os de resistência a antimicrobianos (KONEMAN et al., 1997).

A resistência de *S. aureus* aos antimicrobianos se dá por mutações genéticas ou pela aquisição de genes de resistência de outras bactérias da mesma espécie ou até mesmo de espécies diferentes. As bactérias possuem plasticidade genética, ou seja, tem a capacidade de evoluir em resposta ao ambiente e às pressões seletivas.

A resistência a antimicrobianos é um grande desafio à saúde humana e animal, pelo fato de essas bactérias estarem cada vez mais associadas às transmissões por alimentos, o que pode levar à disseminação dos determinantes da resistência e às falhas terapêuticas. Na saúde humana, os antimicrobianos, além de levarem ao desenvolvimento de resistência, podem causar efeitos tóxicos diretos e podem induzir alergias.

Alimentos de origem animal podem apresentar contaminação oriunda das granjas e fazendas, fator que pode ser agravado pelo manuseio e processamento

inadequado nos frigoríficos. Em seu estudo com bactérias resistentes, Tavares (2000) constatou que cepas de *Staphylococcus* spp. isoladas no Brasil apresentavam resistência à penicilina G, ampicilina e amoxicilina (frequência superior a 70%), além de resistência a oxacilina, meticilina, cefalosporinas e vancomicina.

Voss et al. (2005) isolaram MRSA de pessoas que tiveram contato com suínos e Armand-Lefevre et al. (2005) relataram que a colonização nasal por *S. aureus* em criadores de suínos é devido ao contato com os animais. Dentro da granja, pode ocorrer a disseminação de MRSA, uma vez que a transmissão pode ocorrer por partículas de aerossóis na granja, o que é agravado quando não se faz um adequado vazão sanitário entre os lotes (CHAPIN et al., 2005).

Em termos literais, micro-organismo multidrogarresistente é aquele que apresenta resistência a mais de um agente antimicrobiano. No entanto, autores e autoridades da área, definem uma bactéria como multidrogarresistente (MDR) quando esta se apresenta não susceptível a pelo menos um agente em três ou mais classes de antimicrobianos (MAGIORAKOS et al, 2012). Outra forma de definir uma bactéria como MDR é quando ela é resistente a um agente antimicrobiano chave de importância para a saúde pública. Isso vale para os MRSA, que de acordo com esse conceito são considerados MDR (MAGIORAKOS et al, 2012).

Em MRSA, a resistência múltipla está diretamente relacionada ao tipo de SCC*mec*, elemento genético móvel, da cepa. Os SCC*mec* tipos I, II, III apresentam resistência a antibióticos como macrolídeos, tetraciclina, aminoglicosídeos, rifampicina, quinolonas e cotrimoxazol (HIRAMATSU et al., 1999). Já os SCC*mec* tipo IV e V não possuem nenhum outro determinante de resistência além do gene *mecA*, sendo sensíveis a antibióticos não beta-lactâmicos. O SCC*mec* é um veículo de troca de genes entre as espécies de *Staphylococcus* e frequentemente é responsável pela múltipla resistência, uma vez que essa região tem facilidade para adquirir esses genes (HIRAMATSU et al, 2014).

Segundo QUINN (2011), plasmídeos e transposons são mediadores de múltipla resistência, ou seja, carregam genes de resistência de diferentes classes, tornando-os micro-organismos multirresistentes.

Em virtude da grande habilidade e rapidez em adquirir resistência e pelo fato de ser uma bactéria com capacidade de colonizar diferentes hospedeiros e se difundir por diversos ambientes, *S. aureus* se tornou um micro-organismo relevante na cadeia de produção de carne suína relacionado a resistência. Na última década, o número de micro-organismos isolados de alimentos, que são resistentes a antimicrobianos, tem aumentado consideravelmente (PESAVENTO et al., 2007). Isso se deve ao uso irresponsável de antibióticos em animais e em rações.

Uma vez identificados os patógenos em diferentes etapas da criação de suínos e processamento de carne suína, os isolados obtidos devem ser caracterizados adequadamente para ser possível o estabelecimento de possíveis rotas de contaminação, e associação com isolados obtidos de casos clínicos em animais e seres humanos. Vários fatores de resistência podem ser relacionados aos patógenos usualmente associados a suinocultura, facilmente identificados por técnicas moleculares, como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), que permite a detecção de genes específicos, de forma ágil e precisa (CAMPIONI et al., 2012; CHEN et al., 2009; DEL CERRO et al., 2003; FÀBREGA & VILA, 2012; KECHAGIA et al., 2007; TURKI et al., 2012; VÁZQUEZ-BOLAND et al., 2001).

Atualmente existe uma preocupação bastante significativa em se caracterizar o perfil de resistência de isolados patogênicos a diferentes antimicrobianos. Essa caracterização permite a identificação de cepas que estejam sendo selecionadas por diferentes tipos de pressões ambientais e que possuam tal resistência, o que pode comprometer o tratamento das enfermidades determinadas pelas mesmas. A caracterização dos perfis de resistência a diferentes antimicrobianos usualmente é

realizada por testes fenotípicos, como os recomendados pelo Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI), mas também pela detecção de genes relacionados a resistência.

#### **4.1. Mecanismos de Resistências aos Beta-lactâmicos**

Os beta-lactâmicos são um grupo de antibióticos, constituído por penicilinas, incluindo a meticilina, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenemos. Os componentes deste grupo possuem como característica comum um anel  $\beta$ -lactâmico constituído por três átomos de carbono e um azoto com radicais substituintes (PEREIRA, 2013).

Esta classe de antimicrobianos são bactericidas (bacteriolíticos) e agem por meio da inibição da biossíntese do peptidoglicano na sua fase terminal. Essas substâncias impedem o estabelecimento de pontes interpeptídicas e pentaglicídicas entre cadeias vizinhas do peptidoglicano em crescimento (SOUSA, 2016). As proteínas responsáveis pela transpeptidação e transglicosilação são as enzimas carboxitranspeptidases e transglicosilases, conhecidas como PBP (Protein Binding Penicilin) e ficam no folheto exterior da membrana celular. Cepas de *S. aureus* possuem quatro diferentes tipos de proteínas de ligação à penicilina: PBP1, PBP2, PBP3 e PBP4. Os  $\beta$ -lactâmicos são estruturas análogas do substrato natural das PBPs. Em virtude disso, tem elevada afinidade pelas PBP's. Desta forma, na presença de beta-lactâmicos, a síntese do peptidoglicano é inibida de forma rápida e eficaz.

Até 2007 havia, basicamente, duas vias de resistência aos beta-lactâmicos conhecidas. Um mecanismo é a produção de beta-lactamases, proteína codificada pelo gene *blaZ*, através do qual o antimicrobiano é degradado por meio de uma reação de hidrólise (LÚCIO et al.,2013). A segunda via de resistência envolve o gene *mecA*,

responsável pela produção de uma proteína de ligação à penicilina: PBP2a. Esta proteína funciona como um alvo alternativo resistente ao antibiótico, que permite que a camada de peptidoglicano seja formada, o que evita a morte bacteriana (RIVERA, 2003). No entanto, Paterson et al. (2014) descobriram uma outra via de resistência determinada por um gene homólogo ao *mecA*, que conferiu resistência fenotípica aos beta-lactâmicos em cepas que não possuíam esse gene. Inicialmente este gene ficou conhecido como *mecALGA251*, sendo hoje chamado de *mecC*. A pesquisa do gene *mecA*, é considerada o padrão ouro para detecção de cepas de MRSA (PATERSON et al, 2014). A resistência conferida pelo *mecA* é intrínseca, não sendo devida à destruição das beta-lactamases, mas sim por modificações na estrutura alvo do antimicrobiano.

O termo MRSA é utilizado para designar linhagens de *S. aureus* que não respondem ao tratamento com antibióticos beta-lactâmicos, por possuírem o gene *mecA*, ou serem fenotipicamente resistentes à oxacilina em concentrações maiores do que 4 mg/L (CERQUEIRA & ALMEIDA, 2013). A resistência em função do gene *mecA* se deve à aquisição de um elemento genético móvel conhecido com *SCCmec*, portador do *mecA*, com tamanho entre 21 e 61kb, que está inserido no cromossomo. Este cassette abriga outros genes determinantes de resistências a antimicrobianos além do *mecA*. Esta ilha é composta pelos complexos *mec* e *ccr* e pelas regiões Junkyard (J) (DEURENBERG & STOBBERINGHT, 2008).

O complexo *mec* é composto pelo *mecA*, *IS431mec* e pelos genes regulatórios *mecI/mecR1*. O complexo *ccr* é responsável pela mobilidade desta ilha genômica. Já a região J é formada por vários genes e pseudogenes que se localizam ao redor dos complexos. Embora este fragmento de material genético pareça ser inútil para a bactéria, alguns desses genes podem conferir resistência a antibióticos não beta-lactâmicos e metais pesados (ITO et al., 2003).

O elemento *SCCmec* é subdividido em 11 tipos de acordo com sua composição: I, II, III, IV, V, VI, VII e VIII, IX, X, XI, resultantes da combinação de 5 diferentes genes do complexo *mec* e 8 diferentes genes do complexo *ccr* ([http://www.sccmec.org/Pages/SCC\\_TypesEN.html](http://www.sccmec.org/Pages/SCC_TypesEN.html), acessado em 29 de maio de 2017). Esta diferenciação por tipagem determina a epidemiologia da resistência aos beta-lactâmicos.

Diversos estudos relatam genes homólogos ao *mecA* em diversos animais como mamíferos primitivos, roedores e cavalos, o que é um indicativo de que os animais são a provável origem e reservatório do *mecA*. Pesquisas conduzidas em diferentes espécies animais como cavalos, roedores e primatas revelam que estes são a provável origem do gene *mecA* (PANTOSTI, 2012).

*SCCmec* tipo I, IV, V, VI, VII possuem resistência apenas aos antimicrobianos beta-lactâmicos, pelo fato de possuírem somente o gene *mecA*, integrado aos seus elementos. *SCCmec* II e III são resistentes a múltiplas classes de antimicrobianos em função de genes de resistências adicionais integrados aos seus elementos como plasmídeos e transposons.

O gene *mecA*, é regulado pelo sistema de genes regulatórios *mecI/mecRI*, que codificam as proteínas repressoras *mecI* e indutora *mecRI*, respectivamente. A primeira, reprime a transcrição do gene *mecA*, e *mecI/mecRI* na ausência de beta-lactâmicos. Sendo assim, não há produção de proteína PBP2a, de modo a não haver gasto energético celular desnecessário. Na presença de antibióticos beta-lactâmicos, a proteína *mecRI* é clivada, o que leva à clivagem da proteína *mecI* pela metaloprotease liberada na primeira clivagem. Com a degradação da *mecI*, a região operadora do *mecA* fica livre, permitindo a transcrição do gene e produção da proteína alterada PBP2a (DEURENBERG & STOBBERINGHT, 2008).

Em virtude da existência dos genes reguladores, a resistência fenotípica à oxacilina é extremamente variável e depende da expressão do gene *mecA*. Essa variabilidade é chamada de heterorresistência fenotípica e se caracteriza pelo fato de que uma bactéria pode carregar o gene *mecA*, e não o expressar fenotipicamente.

O gene *blaZ*, que codifica penicilases, é carregado por um plasmídeo, e é regulado por 2 genes cromossomais: *blaR1* e *blaI*, codificadores das proteínas *blaR1* e *blaI*. Estes genes são transcritos em sentidos opostos ao do gene *blaZ*. A *blaI* forma um dímero que impede a transcrição dos genes *blaZ* e *blaR1*. A proteína *blaR1* contém um domínio sensor que possui afinidade por beta-lactâmicos e um domínio enzimático intracelular que é ativado na presença desta classe de antibióticos. Na presença de beta-lactâmicos, o antimicrobiano se liga ao domínio sensor, o que leva à clivagem da proteína *blaR1*, com consequente ativação do domínio enzimático. Este, por sua vez, é responsável pela clivagem da *blaI*. Na ausência desta proteína, há expressão do gene *blaZ* com produção de penicilases, que inativarão a penicilina (LOWY, 2003).

A resistência à penicilina é plasmidial, o que explica a rápida disseminação da resistência. Já a resistência à meticilina é cromossômica, o que justifica um maior tempo para a propagação dos genes de resistência. No entanto, em virtude do uso indiscriminado e excessivo de antimicrobianos na pecuária e na clínica médica e veterinária, hoje em dia há um grande número de cepas MRSA (KITAI et al., 2005).

O gene *mecC* compartilha 70% de homologia de nucleotídeos com o *mecA*, e se encontra em um cassete cromossômico designado *SCCmec* tipo XI (STEGGER et al., 2011). Este novo gene possui sequências altamente divergentes, o que dificulta sua utilização em ensaios moleculares para identificação do gene *mecA*. *mecC* já foi identificado em diversas espécies animais, incluindo bovinos, ovinos, cães, gatos, coelhos e seres humanos, em diferentes países da Europa (MONECKE et al., 2013).

De modo semelhante ao *mecA*, por meio da regulação dos genes *mecI/mecR1*, *mecC* codifica proteínas de membrana, conhecida como PBP2<sub>ALGA</sub>. Da mesma forma que a PBP2a, a PBP2<sub>ALGA</sub> permite a formação do peptidoglicano na presença de beta-lactâmicos, conferindo resistência a este antimicrobiano. No entanto, esta proteína não depende da atividade da transglicosilase, como depende a PBP2a (KIM et al., 2012).

#### **4.2. Mecanismos de Resistências à Vancomicina**

Atualmente, a vancomicina é um dos antibióticos de primeira escolha para o tratamento de infecções por *S. aureus*, sendo considerada o padrão ouro para terapia de doenças invasivas. Vancomicina pertence à classe dos glicopeptídeos que agem por inibição da síntese da parede celular bacteriana. A ação dessa classe de antimicrobianos se dá pela ligação à D-alanil-Dalanina da molécula de peptidoglicano, o que impede a formação de novas unidades dessa substância. A vancomicina é conhecida desde 1956, no entanto, sua utilização foi substituída pela meticilina, devido a maior eficiência.

Entretanto, Hiramatsu et al. (1997) descreveram o primeiro isolado clínico com reduzida sensibilidade à vancomicina. Após esta primeira descrição, foram aparecendo relatos de resistência fenotípica em outros países, como África do Sul, Coreia do Sul, França, Israel, Estados Unidos, Austrália e Brasil (ASKARI et al. 2013, SAKAI et al. 2016).

A resistência à vancomicina está relacionada à aquisição de um plasmídeo contendo o gene *vanA*, proveniente de *Enterococcus faecalis*, por meio de conjugação e consequente transdução, pelos quais o transposon contendo o gene de resistência à vancomicina integrou-se ao plasmídeo de multirresistência do *S. aureus*. Este plasmídeo recombinante do *S. aureus* codifica resistência aos antibióticos beta-lactâmicos, vancomicina, trimetropina, gentamicina, canamicina e tobramicina. Este gene pode ser

transferido entre cepas de *S. aureus* por conjugação (MURRAY et al, 2006). A resistência acontece pela substituição do terminal D-alanil-Dalanina pelo terminal D-alanil-D-lactato, que não possui afinidade pela vancomicina, ocorrendo, normalmente, a síntese da parede celular bacteriana (CHANG et al, 2003).

No entanto, o mecanismo de resistência ainda não está perfeitamente descrito. Há relatos de cepas resistentes à vancomicina que não possuem o gene *vanA*. É possível que a resistência, neste caso, ocorra por espessamento da parede celular, o que não permitiria a penetração do antimicrobiano através desta, impedindo ou dificultando a sua chegada na membrana citoplasmática onde ocorre a síntese do peptidoglicano (TIWARI et al., 2006). Neste caso, as cepas resistentes produziram uma maior quantidade de peptidoglicano e mureína.

As bactérias resistentes à vancomicina apresentam um aspecto macromorfológico diferenciado, com colônias bastante heterogêneas, o que dá a impressão de contaminação (SANTOS et al, 2007).

#### **4.3. Mecanismos de Resistências à Tetraciclina**

A tetraciclina é um antimicrobiano de amplo espectro, com ação bacteriostática e usado para uma grande variedade de bactérias Gram positivas e negativas. A tetraciclina se difunde no interior da célula hospedeira e se liga à subunidade 30S do ribossomo; esta ligação impede a síntese proteica (PEREIRA-MAIA et al, 2010). A resistência à tetraciclina se dá pela aquisição de mais de um gene: há 38 genes conhecidos que conferem esta resistência, e todos utilizam uma das três estratégias a seguir: proteínas de efluxo, proteínas de proteção ribossomal ou inativação enzimática da tetraciclina (ULLAH et al, 2012).

Sabe-se que os genes *tetK* e *tetM* são os mais frequentemente encontrados em *S. aureus* (TRZCINSKI et al, 2000). O gene *tetK* confere resistência por meio de proteínas de efluxo que impedem a acumulação de tetraciclina dentro das células.

## **5. A suinocultura e o uso de antimicrobianos**

A suinocultura e outras produções animais utilizam antimicrobianos administrados em doses sub terapêuticas como promotores de crescimento. A Organização Mundial de Saúde (OMS) define antibiótico promotor de crescimento (APC) como o “agente antibiótico utilizado com o propósito de aumentar o ganho de peso diário ou a eficiência alimentar em animais produtores de alimentos” (GOMES, 2004).

A propriedade de promover o crescimento dos antimicrobianos foi descoberta no final da década de 1940, quando observou-se que frangos alimentados com os resíduos da fermentação da tetraciclina, usado inicialmente como fonte de vitamina B12, cresceram mais do que os animais que não tiveram essa alimentação. Logo se descobriu que o maior crescimento ocorreu devido à presença dos resíduos de tetraciclina e não em função da vitamina B12. O uso de doses sub terapêuticas de antimicrobianos logo se disseminou: além da melhora da conversão alimentar, a baixa dose também promoveu a melhoria da produção de ovos em poedeiras, aumento do tamanho das ninhadas de porcas e aumento da produção de leite em vacas leiteiras (EDQVIST & PEDERSEN, 2001).

A suinocultura, com o passar dos anos, vem evoluindo de sistemas extensivos de criação para sistemas intensivos. Os sistemas “modernos”, que consistem basicamente no confinamento, proporcionam uma performance produtiva elevada, porém mantém os animais sob *stress*, alto desafio ambiental e, conseqüentemente, a imunidade naturalmente adquirida por suínos jovens é menor, o que exige o uso de medicações preventivas e/ou terapêuticas para reduzir a carga infecciosa nos animais e fornecer

melhores condições para seu desenvolvimento. Diante desses desafios, e buscando uma maior produtividade, os suinocultores lançam mão do uso dos APCs. APCs são capazes de melhorar o ganho de peso, diminuir o tempo de engorda, aumentar a eficiência alimentar, prevenir doenças infecciosas e parasitárias, além de diminuir a mortalidade (PALERMO-NETO, 2006).

Os APCs agem diretamente sobre o tecido epitelial intestinal, reduzindo a espessura do mesmo, o que facilita a absorção de nutrientes. Ainda, APCs diminuem a carga de bactérias patogênicas, favorecendo o desenvolvimento e ação das bactérias benéficas. Com a diminuição da parede intestinal, há uma maior irrigação sanguínea com consequente aumento na absorção de vitaminas, aminoácidos e minerais.

O uso dos APCs possibilitou o aumento e intensificação da produção animal (EDQVIST & PEDERSEN, 2001). Em contrapartida, favoreceu o desenvolvimento de bactérias resistentes a inúmeros antimicrobianos. A exposição a longo prazo e a baixos níveis de antimicrobianos pode ter um maior potencial seletivo de cepas resistentes do que a exposição por curto período com dose completa. Além disso, o uso de um único antimicrobiano pode induzir a resistência cruzada (HAO et al., 2014).

Alguns autores consideram que o uso racional de APCs pode desempenhar um papel importante na produção de alimentos. No entanto, o uso irracional leva à resistência bacteriana a antimicrobianos, o que traz inúmeros prejuízos à Saúde Pública. Diante do possível risco causado pelo uso irresponsável, a União Europeia proibiu o uso de alguns antibióticos como promotores de crescimento em 1973. A Suécia proibiu o uso de todo e qualquer antibiótico para este fim dentro de seu território em 1986. Todos os antimicrobianos de baixa dose (5 a 40 ppm) foram proibidos de serem utilizados em animais produtores de alimento pela União Europeia em 2006, prevenindo o desenvolvimento de efeitos negativos. A União Europeia proibiu a importação de produtos de origem animal nos quais foi utilizado antibióticos promotores de crescimento

em 2005. No Brasil, o MAPA proibiu o uso do cloranfenicol, penicilinas, tetraciclina e nitrofuranos em 1998, do olaquinox em 2004, do carbadox em 2005, e da espiramicina e eritromicina em 2012, dentre outros (BRASIL,1998; BRASIL, 2004; BRASIL, 2005; BRASIL, 2012)

Segundo Boelter (1998), a seguinte relação de APCs é utilizada na criação de suínos: tetraciclina, penicilina, diidroestreptomicina, espectinomicina, kitasamicina, eritromicina, espiramicina, tilosina, virgiamicina, lincomicina, florfenicol, higromicina B, destomicina, flavomicina, tiamulina, salinomicina e ceftiofur. Ainda, Spinosa (2002) indica a inclusão de colistina, enramicina, nitrovin e olaquinox.

Alguns antimicrobianos são mais utilizados, como é o caso da colistina, que possui ação contra bactérias Gram negativas, e da tilosina, macrolídeo muito utilizado contra bactérias Gram positivas (McORIST et al, 1999). Em 2016, por meio da Instrução Normativa Nº 45 de 22 de novembro de 2016, o MAPA proibiu o uso de colistina como aditivo zootécnico melhorador de desempenho (BRASIL, 2016).

Essa prática de utilizar antibióticos promotores de crescimento nos sistemas de produção atuais pode representar risco à saúde pública, uma vez que a ingestão de produtos de origem animal com resíduos de antimicrobianos pode promover a seleção de cepas bacterianas e o aumento da sua resistência a tratamentos convencionais em animais e em seres humanos, além de facilitar a transmissão de genes relacionados aos mecanismos de resistências a bactérias de outros gêneros (OMS, 2000)

Todo medicamento utilizado na produção animal, para qualquer finalidade, deve respeitar o período de carência, definido de acordo com o princípio ativo, dosagem, via de administração e espécie animal. Muitas vezes, esse período é desrespeitado deixando resíduos na carne (BOOTH, 1992). Entretanto, atualmente a preocupação mundial em relação ao uso de antimicrobianos na produção animal está relacionada ao desenvolvimento de resistência nos micro-organismos.



## Referências Bibliográficas

- ABCS, Associação Brasileira dos Criadores de Suínos. **Produção de Suínos: Teoria e Prática**, Brasília, 2014. 908p.
- ABPA, Associação Brasileira de Proteína Animal. **Cenário Carnes 2014/2015**, São Paulo, SP. 2015. 21p.
- ABPA, Associação Brasileira de Proteína Animal. **Relatório Anual 2015**, São Paulo, SP. 2015. 248p.
- ABRAHAM, E.P. & CHAIN, E. Na enzyme from bactéria able to destroy penicillin. *Reviews of Infectious Diseses*, v.10, n. 4, p. 677-685, 1988.
- ALGINO, R.J.; BADTRAM, G.A.; INGHAM, B.H.; INGHAM, S.C. Factors associated with Salmonella Prevalence on pork carcasses in very small abattoirs in Wisconsin. **Journal of Food Protection**, v. 72, n. 4, p. 714-721, 2009.
- AMARAL, A. L.; SILVEIRA, P. R. S.; LIMA, G. J. M. M. Boas práticas de produção de suínos. **Circular Técnica - Embrapa Suínos e Aves**, v. 50, p. 1-60, 2006.
- APPELBAUM, P. C. Microbiology of Antibiotic Resistance in *Staphylococcus aureus*. **Clinical Infectious Diseases**, v. 45, p. 165-170, 2007.
- ARMAND-LEFEVRE, L. RUIMY, R.; ANDREMONT, A. Clonal comparison of *Staphylococcus aureus* isolates from healthy pig farmers, human controls and pigs. **Emerging Infectious Diseases**, v.11, n.5, p.711-714, 2005.
- ASKARI, E.; TABATABAI, S.M.; ARIANPOOR, A.; NASAB, M.N. *VanA*-positive vancomycin resistant *Staphylococcus aureus*: Systematic search and review of reported cases. **Infectious Diseases in Clinical Practice**, v.21, n.2, p. 91-93, 2013.
- BASSANI, M. T. Caracterização de grupos agr e sua relação com perfil enterotoxigênico e antimicrobiano em *Staphylococcus aureus* isolados de diferentes origens. **2009. 68 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS,2009.**
- BATALHA, M. O.& SILVA, A. L. **Gerenciamento de sistemas agroindustriais: definições, especificidades e correntes metodológicas**. 3 ed. São Paulo: Atlas, 2007. 62p.
- BERGDOLL, M.S. WONG, A.C.L. Staphylococccal intoxications, In: Cliver, D., Potter, M., Riemann, H.P. **Foodborne Infections and Intoxications**.3ed. Califórnia: Academic Press, 2006. p. 523-556.
- BOELTER, R. **Farmacologia Veterinária – Temas Escolhidos**: Resíduos de Antibióticos nos Alimentos de Origem Animal. Rio Grande do Sul: Ed. Agropecuária LTDA, 1998.
- BOOTH, N.H; MCDONALD, L.E; **Farmacologia e Terapêutica em Veterinária**. 6ed. Rio de Janeiro: Ed Guanabara Koogan, 1992.
- BRASIL. Portaria Ministerial n. 193 de 12 de maio de 1998. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**, Brasília, 12 mai. 1998.

- BRASIL. Instrução Normativa n. 11 de 24 de novembro de 2004. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**, Brasília, 11 nov. 2004.
- BRASIL. Instrução Normativa n. 35 de 14 de novembro de 2005. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**, Brasília, 14 nov. 2005.
- BRASIL. Instrução Normativa n. 14 de 17 de maio de 2012. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**, Brasília, 17 maio. 2012.
- BRASIL. Instrução Normativa n. 45 de 22 de novembro de 2016. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**, Brasília, 22 nov. 2016.
- BRASIL. Norma Interna n. 01, de 08 de março de 2017. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**, Brasília, 08 mar. 2017.
- BROENS, E.M.; GRAAT, E.A.M.; VAN DER WOLF, P.J.; VAN DE GIESSEN, A.W.; DE JONG, M.C.M. Transmission of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* among pigs during transportation from farm to abattoir. **The Veterinary Journal**, v. 189, n.3, p. 302-305, 2011.
- BUSSCHER, J.F.; VAN DUIJKEREN, E.; SLOET VAN OLDRUITENBORGH-OOSTERBAAN, M.M. The prevalence of methicillin-resistant staphylococci in healthy horses in the Netherlands. **Veterinary Microbiology**, v113, p. 131–136, 2006.
- CAMPIONI, F.; MORATTO, A.M.B.; FALCÃO, J.P. Genetic diversity, virulence genes and antimicrobial resistance of *Salmonella* Enteritidis isolated from food and humans over a 24-year period in Brazil. **Food Microbiology**, v. 32, p. 254-264, 2012.
- CDC, **Centers for Disease Control and Prevention**, 2017. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/hai/organisms/mrsa-infection.html> >. Acesso em 20 abr. 2017.
- CÊ, E.R. Influência das etapas de processo de abate de suínos na prevalência de patógenos e níveis de microrganismos indicadores de qualidade e higiene. 2016. 81f. Dissertação (Mestrado Profissional em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, PR, 2016.
- CERQUEIRA, E.S. & ALMEIDA, R.C.C. *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA) em alimentos de origem animal: uma revisão sistemática. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 72, n.4, p. 268-281, 2013.
- CHANG, S.; SIEVERT, D.M.; HAGEMAN, J.C.; BOULTON, M.L.; TENOVER, F.C.; DOWNES, F.P.; SHAH, S.; RUDRIK, J.T.; PUPP, G.R.; BROWN, W.J.; CARDO, D.; FRIDKIN, S.K. Infection with Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus* Containing the vanA Resistance Gene. **The New England Journal of Medicine**, v. 348, p. 1342–1347, 2003.
- CHAPIN, A.; RULE, A.; GIBSON, K.; BUCKLEY, T.; SCHWAB, K. Airborne multidrug-resistant bacteria isolated from a concentrated swine feeding operation. **Environmental Health Perspectives**, v. 113, n. 2, p.137-142, 2005.
- CHEN, J., LUO, X.; JIANG, L.; JIN, P.; WEI, W.; LIU, D.; FANG, W. Molecular characteristics and virulence potential of *Listeria monocytogenes* isolates from Chinese food systems. **Food Microbiology**, v.26, p. 103-111, 2009.

- CHOI, Y.M.; PARK, H.J.; JANG, H.I.; KIM, S.A.; IMM, J.Y.; HWANG, I.G.; RHEE, M.S. Changes in microbial contamination levels of porcine carcasses and fresh pork in slaughterhouses, processing lines, retail outlets, and local markets by commercial distribution. **Research in Veterinary Science**, v. 94, n.3, p. 413-418, 2013.
- CONAB. **Companhia Nacional de Abastecimento**: Suprimento de Carne. CONAB, Brasília, DF, 2013.
- D'SILVA, J., Factory farming and developing countries: a compassion in world farming trust briefing. **Compassion in World Farming Trust**, Petersfield, Hampshire, Inglaterra, 2000. 17p.
- DE BOER, E.; ZWARTKRUIS-NAHUIS, J. T. M.; WIT, B.; HUIJSDENS, X.W.; NEELING, A.J.; BOSCH, T. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in meat. **International Journal of Food Microbiology**, v.134, n. 1, p.52-58, 2009.
- DE BUYSER, M.-L.; DUFOUR, B.; MAIRE, M.; LAFARGE, V. Implication of milk and milk products in food-borne diseases in France and in different industrialised countries. **International Journal of Food Microbiology**, v. 67, p. 1-17, 2001.
- DE NEELING, A.J.; VAN DEN BROEK, M.J.M; SPALBURG, E.C.; VAN SANTEN-VERHEUVEL, M.G.; DAM-DEISZ, W.D.C.; BOSHUIZEN, H.C.; VAN DE GIESSEN, A.W.; VAN DUIJCKEREN, E.; HUIJSDENS, X.W. High prevalence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in pigs. **Veterinary Microbiology**, v.122, p. 366-372, 2007.
- DEL CERRO, A.; SOTO, S.M.; MENDONZA, M.C. Virulence and antimicrobial-resistance gene profiles determined by PCR-based procedures for *Salmonella* isolated from samples of animal origin. **Food Microbiology**, v.20, p.431-438, 2003.
- DELHALLE, L.; DE SADELEER, L.; BOLLAERTS, K.; FARNIR, F.; SAEGERMAN, C.; KORSACK, N.; DEWULF, J.; DE ZUTTER, L.; DAUBE, G. Risk factors for *Salmonella* and hygiene indicators in the 10 largest Belgian pig slaughterhouses. **Journal of Food Protection**, v. 71, n. 7, p. 1320-1329, 2008.
- DEUREBERG, R.H. & STOBBERINGHT, E.E. The evolution of *Staphylococcus aureus*. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 8, p.747-763, 2008.
- BROENS, E.M.; GRAAT, E.A.M.; VAN DER WOLF, P.J.; VAN DE GIESSEN, A.W.; DE JONG, M.C.M. Prevalence and risk factor analysis of livestock associated MRSA-positive pig herds in The Netherlands. **Preventive Veterinary Medicine**, v.102, p.41-49, 2011.
- EDQVIST, L.E. & PEDERSEN, K.B. Antimicrobials as growth promoters: resistance to common sense. **Late lessons from early warnings: the precautionary principle 1896-2000**, v.22, p.93-100, 2001.
- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. Analysis of the baseline survey on the prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in holdings with breeding pigs, in the EU, 2008. **EFSA Journal**, v.7, n. 11, p.1-82, 2009.
- EUROPEAN COMMISSION. EC. From farm to fork - Safe food for Europe's consumers, p. 28, 2004. Disponível em:

- <[http://ec.europa.eu/dgs/health\\_foodsafety/information\\_sources/docs/from\\_farm\\_to\\_fork\\_2004\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/dgs/health_foodsafety/information_sources/docs/from_farm_to_fork_2004_en.pdf). Acesso em: 23 abr. 2017.
- EUZÉBY, J.P. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature Genus *Staphylococcus*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. 2012.
- FÀBREGA, A. & VILA, J. Yersinia enterocolitica: Pathogenesis, virulence and antimicrobial resistance. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v.30, p.24-32, 2012.
- FEBLER, A.T.; KADLEC, K.; HASSEL, M.; HAUSCHIL, D.T.; EIDAM, C.; EHRICHT, R.; MONECKE, S.; SCHWARZ, S. Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from food and food products of poultry origin in Germany. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 20, p. 7151–7157, 2011.
- FOSSE, J.; SEEGER, H.; MAGRAS, C. Foodborne zoonoses due to meat: A quantitative approach for a comparative risk assessment applied to pig slaughtering in Europe. **Veterinary Research**, v. 39, n. 1, 2008.
- GERVASIO, E. W. Suinocultura - Análise da Conjuntura Agropecuária: SEAB – Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento do Paraná, p. 2, 2013. Disponível em: [http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/SuinoCultura\\_2012\\_2013.pdf](http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/SuinoCultura_2012_2013.pdf). Acesso em: 10 jul. 2017.
- GOMES, D.M. **Resíduos de Antibióticos Promotores de Crescimento em Produtos de Origem Animal**. 2004. 69 f. Monografia (Especialista em Qualidade em Alimentos) – Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2004.
- GOMES, M. J.P. Gênero *Staphylococcus* spp. Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/labacvet/files/G%C3%AAnero%20Staphylococcus%20spp%204-2013-1.pdf>>. Acesso em: 07 de maio de 2017.
- HAO, H.; CHENG, G.; IQBAL, Z.; AI, X.; HUSSAIN, H.I.; HUANG, L.; DALM.; WANG, Y.; LIU, Z.; YUAN, Z. Benefits and risks of antimicrobial use in food-producing animals. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. 288, p. 1-11, 2014.
- HERMANS, K.; DEVRIESE, L.A.; HAESBROUCK, F., 2008. In: GYLES, C.L., PRESCOTT, J.F., SONGER, J.G., THOEN, C.O. **Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals**. 4 ed. United States: Blackwell Publishing Professional, 2008. p. 43-57.
- HIRAMATSU, K. KATAYAMA, Y.; MATSUO, M.; SASAKI, T.; MORIMOTO, Y.; SEKIGUCHI, A.; BABA, T. Multi-drug resistant *Staphylococcus aureus* and future chemotherapy. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 20, p. 593-601, 2014.
- HIRAMATSU, K.; HANAKI, H.; INO, T. YATUBA, K.; OGURI, T.; TENOVER, F.C. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 40, n. 1, p.135-141, 1997.
- HIRAMATSU, K.; ITO, T.; HAKANI, H. Mechanisms of methicillin and vancomycin in *Staphylococcus aureus*. **Clinical Infectious Diseases**, v.5, p-221-242, 1999.
- IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção da Pecuária Municipal 2014**, Rio de Janeiro, RJ, v.42, p. 1-49, 2014.

- IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção da Pecuária Municipal 2015**, Rio de Janeiro, RJ, v.43, p. 1-49, 2015.
- ITO, T.; OKUMA, K.; MAXX, YUZAWA, H.; HIRAMATSU, K. Insights on antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* from its whole genome: genomic island SCC. **Drug Resistance Updates**, v.6, n.1, p. 41-52,2003.
- KAFERSTEIN, F.K. Actions to reverse the upward curve of foodborne illness. **Food Control**, v. 4, p. 101-109, 2003.
- KECHAGIA, N.; NICOLAU, C.; IOANNIDOU, V.; KOURTI, E.; IOANNIDIS, A.; LEGAKIS, N.J.; CHATZIPANAGIOTOU, S. Detection of chromosomal and plasmid encoded virulence determinants in *Yersinia enterocolitica* and other *Yersinia* spp. isolated from food animals in Greece. **International Journal of Food Microbiology**, v.118, p.326-331, 2007.
- KIM, C.; MILHEIRIÇO, C.; GARDETE, S.; HOLMES, M.A.; HOLDEN, M.T.; DE LENCASTRE, H.; TOMAZS, A. Properties of a novel PBP2A protein homolog from *Staphylococcus aureus* strain LGA251 and its contribution to the betalactam-resistant phenotype. **Journal of Biological Chemistry**. v.287, n. 44, p. 36854–36863, 2012.
- KITAI, S.; SHIMIZU, A.; KAWANO, J.; SATO, E., NAKANO, C.; UJI, T.; KITAGAWA, H. Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from retail raw chicken meat in Japan. **Journal of Veterinary and Medical Science**, v. 67, p. 107–110, 2005.
- KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN, J.R. Color Atlas and textbook of diagnostic microbiology. 5.ed. Philadelphia: Lippincott/Williams & Wilkins, 1997. 1395p.
- LEE, J. H. Methicilin (Oxacilin) – resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from major food animals and their potencial transmission to humans. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, n11, p. 6489 – 6494, 2003.
- LE LOIR, Y.; BARON, F.; GAUTIER, M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. **Genetics and Molecular Research**, v.2, n. 1, p. 63-76, 2003.
- LIMA, E.S.C.; PINTO, P.S.A.; SANTOS, J. L.; VANETTI, M.C.D.; BEVILACQUA, P.D.; ALMEIDA, L.P.; PINTO, M.S.; DIAS, F.C. Isolamento de *Salmonella* sp. e *Staphylococcus aureus* no processo do abate suíno com subsídio ao sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle – APPCC. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 24, n. 4 p. 185- 190, 2004.
- LOWY, F.D. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Investigation**, v.111, p.1265–1273, 2003.
- LÚCIO, E. C.; OLIVEIRA, J. M. B.; GOUVEIA, G. V.; COSTA, M. M.; BRANDESPIM, D.F.; MOTA, R. A.; PINHEIRO JÚNIOR, J. W. Pesquisa dos genes *mecA* e *blaZ* em cepas de *Staphylococcus* spp. isoladas de mastite bovina na microrregião de Garanhuns. **XIII Jornada de ensino, pesquisa e extensão – JEPEX 2013 – UFRPE, Recife/PE**, 2013.
- LUONG, T.; DUNMAN, P. M.; MURPHY, E.; PROJAN, S. J.; Y. LEE, C. Y. Transcription Profiling of the *mgrA* Regulon in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**, v. 188, n. 05, p. 1899–1910, 2006.

- MAGIORAKOS, A. P.; SRINIVASAN, A.; CAREY, R.B.; CARMELI, Y.; FALAGAS, M.E.; GISKE, C.G.; HARBARTH, S.; HINDLER, J.F.; KAHLMETER, G.; OLSSON-LILJEQUIST, B.; PATERSON, D.L.; RICE, L.B.; STELLING, J.; STRUELENS, M.J.; VATOPOULOS, A.; WEBER, J.T.; MONNET, D.L. Multidrug-resistance, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, p. 268-281, 2012.
- MASSON, G. C. I. H.; FERREIRA, G.S.; CARVALHO, L.F.O.S. Perfil de resistência a antimicrobianos de *Staphylococcus aureus* isolados de granjas e frigoríficos de suínos. **Archives of Veterinary Science**, v.17, n. 1, p. 1-14, 2012.
- McORIST, S.; SMITH, S. H.; KLEIN, T. Monitored control programme for proliferative enteropathy on British pig farms. **Veterinary Record**, v. 144, n. 8, p. 202- 204, 1999.
- MEEMKEN, D.; BLAHA, T.; TEGELER, R.; TENHAGEN, B. A.; GUERRA, B.; HAMMERL, J. A.; HERTWIQ, S.; APPEL, B.; FETSCH, A. Livestock associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (LA-MRSA) isolated from lesions of pigs at necropsy in northwest Germany between 2004 and 2007. **Zoonoses Public Health**, n. 57, p. 143–148, 2010.
- MONECKE, S.; GAVIER-WIDEN, D.; MATTSSON, R.; RANGSTRUP-CHRISTENSEN, L.; LAZARIS, A.; COLEMAN, D.C.; SHORE, A.C.; EHRLICH, R.. Detection of *mecC*-Positive *Staphylococcus aureus* (CC130-MRSA-XI) in Diseased European Hedgehogs (*Erinaceus europaeus*) in Sweden. **Plos One**, v. 8, n. 6, p.1-6, 2013.
- MURRAY, P.R.; ROSENTHAL, K.S.; PFALLER, M.A. **Medical Microbiology**. 5 ed. Filadélfia: Elsevier Editora Ltda, 2006. 836p.
- OVERESCH, G.; BUTTNER, S.; ROSSANO, A.; PERRETEN, V. The increase of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and the presence of an unusual sequence type ST49 in slaughter pigs in Switzerland. **BMC Veterinary Research**, v. 7, n.30, p. 1-9, 2011.
- PALERMO-NETO, J. Considerações gerais sobre o uso de agentes que alteram a produção animal. In: SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. 685p.
- PANTOSTI, A.; SANCHINI, A.; MONACO, M. Mechanisms of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. **Future Microbiology**, v. 2, n.3, p. 323-334, 2007.
- PANTOSTI, A. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* associated with animals and its relevance to human health. **Frontiers in Microbiology**. v. 3, n. 127, p.1-12, 2012.
- PATERSON, G.K.; HARRISON, E.M.; HOLMES, M.A. The Emergence of *mecC* methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Trends in Microbiology**, v. 22, n. 1, 2014.
- PEREIRA I. A. ***Staphylococcus aureus* resistente à meticilina**. 2013. 27f. Monografia (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal, 2013.
- PEREIRA-MAIA, E.C.; SILVA, P.P.; ALMEIDA, W.B.; SANTOS, H.F.; MARCIAL, B.L.; RUGGIERO, R.; GUERRA, W. Tetraciclina e Glicilglicinas: uma visão geral. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 700-706, 2010.

- PESAVENTO, G.; DUCCI, B.; COMODO, N.; LO NOSTRO, A. Antimicrobial resistance profile of *Staphylococcus aureus* isolated from raw meat: A research for methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Food Control**, v.18, n. 3, p.196-200, 2007.
- PINTO, P.S.A. **Inspeção e Higiene de Carnes**. 2ed. Viçosa: Editora UFV,2014. 389p.
- QUINN, P.J.; MARKEY, B.K.; CARTER, M.E.; DONNELLY, W.J.; LEONARD, F.C. **Veterinary Microbiology and Microbial Disease**. 2.ed. Iowa: Wiley-blackwell, 2011.1231p.
- RIVERA-TAPIA, J.A. Antibiotic resistance, public health problem. **Anales Médicos Asociación Médica del Hospital ABC**; v.48, n.1, p.42-47, 2003.
- SAKAI, Y.; QIN, L.; MIURA, M.; MASUNAGA, K.; TANAMACHI, C.; IWAHASHI, J.; KIDA, Y.; TAKASU, O.; SAKAMOTO, T.; WATANABE, H. Successful infection control for a vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus* outbreak in an advanced emergency medical service centre. **Journal of Hospital Infection**, v. 92, n.4, p. 385-391, 2016.
- SANTOS, A.L.; SANTOS, D.O.; FREITAS, C.C.; FERREIRA, B.L.A.; AFONSO, I.L.; RODRIGUES, C.R.; CASTRO, H.C. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia Médica Laboratorial**, v.43, n.6, p.413-423, 2007.
- SERGIO, D. M. B.; TSE, KOH, T.H.; HSU, L.; OGDEN, B.E.; GOH, A.L.H; CHOW, P.K.H. Investigation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pigs used for research. **Journal of Medical Microbiology**, v. 56, p.1107-1109, 2007.
- SORUM, H. & L\_ABÈÈ-LUND, T. M. Antibiotic resistance in foodrelated bacteria – a result of interfering with the global web of bacterial genetics. **International Journal of Food Microbiology**, v. 78, p. 43–56, 2002.
- SOUSA, J. C. **Manual de Antibióticos Antibacterianos**. 2 ed. Porto: Edições Universidade Fernando Pessoa, 2016. 370p.
- SPECHA, C.; STEPHAN, R.; ZWEIFEL, C. Microbiological contamination of pig carcasses at different stages of slaughter in two European Union - approved 58 abattoirs. **Journal of Food Protection**, v.69, n.11, p. 2568 – 2575, 2006
- SPINOSA, H.S; GÓRNIK, S.L; BERNARDI, M.M; **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária** 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.
- STEGGER, M.; ANDERSEN, P.S.; KEARNS, A.; PICHON, B.; HOLMES, M.A.; EDWARDS, G.; LAURENT, F.; TEALE, C.; SKOV, R.; LARSEN, A.R. Rapid detection, differentiation and typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* harbouring either *mecA* or the new *mecA* homologue *mecALGA251*. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, p. 395-400, 2011.
- TAYLOR, D. J. Miscellaneous bacterial infections. In: STRAW, E. B.; D'ALLAIRE, S. MENGELING, W. L. **Diseases of Swine**. 8. Ed. Iowa: Iowa State University, 1999. cap. 44, p. 613 – 642.

- TANIH, N.F.; SEKWADI, E.; NDIP, R.N.; BESSONG, P.O. Detection of pathogenic *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* from cattle and pigs slaughtered in abattoirs in Vhembe District, South Africa. **Scientific World Journal**, v. 2015, p.1-8, 2015.
- TAVARES, W. **Manual de Antibióticos e Quimioterápicos Anti-infecciosos**. Rio de Janeiro: Ed Atheneu, 1990. 515p.
- TAVARES, W. Bactérias gram-positivas problemáticas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 33, n. 3, p. 281-301, 2000.
- TENHAGEM, B. A.; FETSCH, A.; STÜHRENBERG, B.; SCHLEUTER, G.; GUERRA, B.; HAMMERL, J.A.; HERTWIG, S.; KOWALL, J.; KÄMPE, U.; SCHROETER, A.; BRÄUNIG, J.; KÄSBOHRER, A.; APPEL, B. Prevalence of MRSA types in slaughter pigs in different German abattoirs. **Veterinary Record**, v. 165, n. 20, p. 589 – 593, 2009.
- TIWARI, H.K. & SEN, M.R. Emergence of vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* (VRSA) from a tertiary care hospital from northern part of India. **BMC Infectious Diseases**, v.6, n. 156, p.1-6, 2006.
- TRZCINSKI, K.; COOPER, B.S.; HRYNIEWICZ, W.; DOWSON, C.G. Expression of resistance to tetracyclines in strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.45, n.6, p.763-70, 2000.
- TURKI, Y., OUZARI, H., MEHRI, I., BEN AISSA, R., HASSEN, A. Biofilm formation, virulence gene and multi-drug resistance in *Salmonella* Kentucky isolated in Tunisia. **Food Research International**, v. 45, p.940-946, 2012.
- ULLAH, F.; MALIK, S.A.; AHMED, J.; ULLAH, F.; SHAH, S.M.; AYAZ, M.; HUSSAIN, S.; KHATOON, L. Investigation of the Genetic Basis of Tetracycline Resistance in *Staphylococcus aureus* from Pakistan. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 11, n.; 6, p. 925-931, 2012.
- USDA, United States Department of Agriculture. **Industry & Trade Summary**. Office of Industries Publication ITS-11 N. Control 2014002, Outubro, 2014.
- VAN CLEEF, B.A.G.L.; ROENS, E.M.; VOSS, A.; HUIJSDENS, X.W.; ZUCHNER, L.; VAN BETHEM, B.H.B.; KLUYTMANS, J.A.J.W.; MULDER, M.N.; VAN DE GIENSSSEN, A.W. High prevalence of nasal MRSA carriage in slaughterhouse workers in contact with live pigs in The Netherlands. **Epidemiology infectious**, v.138, p.756-763, 2010.
- VÁZQUEZ-BOLAND, J.A.; DOMPINGUEZ-BERNAL, G.; GONZÁLEZ-ZORN, B.; KREFT, J.; GOEBEL, W. Pathogenicity islands and virulence evolution in *Listeria*. **Microbes and Infection**, v. 3, p.571-584, 2001.
- VOSS, A.; LOEFFEN, F.; BAKKER, J.; KLAASSEN, C.; WULF, M. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pig farming. **Emerging Infectious Diseases**, v.11, n.12, p 1965-1966, 2005.
- WEESE, J.S.; DICK, H.; WILLEY, B.M.; MCGEER, A.; KREISWIRTH, B.N.; INNIS, B.; LOW, D.E. Suspected transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* between

domestic pets and humans in veterinary clinics and in the household. **Veterinary Microbiology**, v.115, p.148-155, 2006.

WITTE, W. Ecological impact of antibiotic use in animals on different complex microflora: environment. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.14, n.4, p.321-325, 2000.

## OBJETIVOS

### Objetivo Geral

O presente estudo teve como objetivo geral identificar e rastrear os principais pontos de contaminação por *Staphylococcus* coagulase positiva e *S. aureus* resistentes a antimicrobianos na cadeia produtiva de carne suína.

### Objetivos Específicos

- ✓ Identificar os principais pontos de contaminação por *Staphylococcus* coagulase positiva em importantes pontos da cadeia produtiva de carne suína
- ✓ Avaliar a resistência de isolados de *Staphylococcus aureus* em relação a diferentes tipos de antimicrobianos
- ✓ Caracterizar os perfis genéticos de *Staphylococcus aureus* considerando genes associados a resistência a antimicrobianos
- ✓ Avaliar a correspondência entre resultados fenotípicos e genotípicos para caracterização de resistência a antimicrobianos em *Staphylococcus aureus*

**ARTIGO CIENTÍFICO:**

***Staphylococcus* COAGULASE POSITIVA E *Staphylococcus aureus*  
RESISTENTES A ANTIBIÓTICOS NA CADEIA PRODUTIVA DE CARNE  
SUÍNA**

Clarisse Vieira Botelho et al.

Artigo científico a ser submetido ao periódico *Veterinary Microbiology*,

Journal Citation Reports 2015, Impact Factor: 2.564

## RESUMO

O objetivo desse estudo foi rastrear a contaminação por *Staphylococcus* coagulase positiva (SCP) e *S. aureus* resistentes a antibióticos na cadeia produtiva de carne suína. Duas granjas e um frigorífico foram selecionados para coleta de 603 amostras ao longo da cadeia produtiva para enumeração de SCP. A maior parte das amostras apresentaram SCP em contagens inferiores a 2 log UFC/cm<sup>2</sup> ou g (n = 512, 84,9%). Contagens superiores a 4 log UFC/cm<sup>2</sup> ou g (n = 33, 5,5%) foram observadas em baias de terminação, carcaças após evisceração, carcaças após lavagem, facas limpas, mesas limpas, costela e linguiças. Durante o abate, as contagens médias de SCP obtidas nas carcaças após sangria foram superiores quando comparadas as etapas posteriores (p > 0,05). Um total de 315 colônias de SCP foi selecionado, sendo 246 identificadas como *S. aureus* (*femA* e perfil bioquímico), submetidas a testes de susceptibilidade a 11 antibióticos e a pesquisa de genes relacionados a resistência. Apenas 15 isolados foram susceptíveis a todos os antibióticos testados, 7 a apenas um antibiótico, e os demais resistentes simultaneamente a 2 a 10 antibióticos; o perfil de resistência a penicilina-eritromicina-ciprofloxacina-sulfamethoxazole foi o que apresentou maior frequência entre os isolados (n = 37). *blaZ* (penicilina) foi detectado em 74,0% dos isolados, *femB* (oxacilina) em 8,1%, e *tetK* (tetraciclina) em 3,7%; *vanA* (vancomicina), *mecA* e *mecC* (oxacilina) não foram detectados. Adicionalmente, 15 apresentaram simultaneamente os genes *femB-blaZ*, 4 os genes *blaZ-tetK*, e 3 os genes *femB-blaZ-tetK*. Equivalência entre os resultados fenotípicos e genotípicos foi observada apenas para tetraciclina (p = 0,147). Os resultados obtidos demonstram a relevância de SCP como indicadores de manipulação e higiene na cadeia produtiva de carne suína, assim como a presença de *S. aureus* com resistência a diferentes antibióticos.

Palavras-chave: *Staphylococcus aureus*, resistência, antibióticos, carne suína

## ABSTRACT

The objective of this study was to track contamination by antibiotic resistant *Staphylococcus* coagulase positive (SCP) and *S. aureus* in the pork production chain. Two farms and one refrigerator were selected to collect 603 samples along the production chain for SCP enumeration. Most of the samples had SCP in counts less than 2 log CFU / cm<sup>2</sup> or g (n = 512, 84.9%). Counts greater than 4 log CFU / cm<sup>2</sup> or g (n = 33, 5.5%) were observed in termination stalls, carcasses after evisceration, carcasses after washing, clean knives, clean tables, ribs and sausages. During slaughter, the SCP mean counts obtained on carcasses after bleeding were higher when compared to the later stages (p > 0.05). A total of 315 SCP colonies were selected, 246 were identified as *S. aureus* (*femA* and biochemical profile), susceptible to 11 antibiotic susceptibility tests and resistance-related genes. Only 15 isolates are susceptible to all antibiotics tested, 7 to only one antibiotic, and two are simultaneously resistant to 2 to 10 antibiotics; the profile of resistance to penicillin-erythromycin-ciprofloxacin-sulfamethoxazole presented greater frequency among the isolates (n = 37). *blaZ* (penicillin) was detected in 74.0% of the isolates, *femB* (oxacillin) in 8.1%, and *tetK* (tetracycline) in 3.7%; *vanA* (vancomycin), *mecA* and *mecC* (oxacillin) were not detected. Additionally, 15 of them simultaneously simulate the *femB-blaZ* genes, 4 *blaZ-tetK* genes, and 3 *femB-blaZ-tetK* genes. Equivalence between phenotypic and genotypic results was observed only for tetracycline (p = 0.147). The results obtained demonstrate the relevancy of SCP as indicators of manipulation and hygiene of the meat production chain, as well as the presence of *S. aureus* with resistance to different antibiotics.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, resistance, antibiotics, pork

## 1. Introdução

O Brasil é um importante produtor mundial de alimentos, sendo o quarto maior produtor mundial de carne suína. A produção brasileira de carne suína vem apresentando significativo crescimento nos últimos vinte anos (AMARAL et al., 2006). Em termos *per capita*, o consumo de carne suína no Brasil cresce de forma gradativa, apesar de ainda ser menor que o consumo de carne de aves e bovina (ABPA, 2015). Em virtude da crescente demanda interna e externa, os sistemas de criação de suínos foram se adaptando a fim de alcançar uma maior produtividade.

Para isso, os sistemas de criação deixaram de ser extensivos e se tornaram intensivos, o que demanda um maior uso de medicações profiláticas e terapêuticas, uma vez que o desafio ambiental é maior (D'SILVA, 2000). Ainda, tornou-se prática comum o uso de antibióticos promotores de crescimento com o objetivo de incrementar a performance produtiva (PALERMO-NETO, 2006). O uso sem critérios de antibióticos culminou no desenvolvimento de micro-organismos resistentes a essas substâncias. Diferentes espécies de micro-organismos podem ser resistentes naturalmente a diferentes antibióticos; porém, a administração de diferentes substâncias pode determinar a seleção de cepas resistentes, e fatores genéticos relacionados a resistência podem ser transferidos para outros micro-organismos (WHO, 2017).

A resistência a antibióticos é um problema para a Saúde Pública e pode ser transmitida aos seres humanos de diferentes maneiras. Neste contexto, *Staphylococcus aureus* se destaca por sua capacidade de desenvolver resistência a diferentes antimicrobianos de forma rápida e eficaz, e por sua habilidade de se desenvolver e diferentes tipos de ambiente (DE BUYSER et al, 2001). *S. aureus* compõe a microbiota natural da pele e de órgãos respiratórios de mamíferos e aves e está presente em humanos e suínos de todas as idades.

Assim, o presente estudo teve como objetivo rastrear a contaminação de *Staphylococcus* coagulase positiva e *S. aureus* em importantes pontos da cadeia produtiva de carne suína, desde as etapas de produção nas granjas e abate e processamento dentro das plantas frigoríficas. Adicionalmente, o estudo teve como objetivo caracterizar o perfil de resistência a antibióticos de isolados de *S. aureus*.

## **2. Material e Métodos**

### ***2.1. Área de estudo e coleta de amostras***

Duas granjas de suínos de ciclo completo e em um matadouro-frigorífico, com Serviço de Inspeção Federal, localizados na região de Viçosa (MG), foram selecionados para coleta de amostras ao longo da cadeia produtiva de carne suína. Nove visitas foram realizadas nesses locais para coleta de amostras ambientais nas baias de terminação, onde ficavam os suínos que seguiriam para abate naquele mesmo dia. No matadouro-frigorífico, foram coletadas amostras das carcaças dos suínos no ambiente de abate e processamento de carne suína. A Tabela 1 descreve os pontos de amostragem e o número de amostras coletadas.

As amostras superficiais das baias de terminação foram obtidas por meio da técnica de *overshoes* estéreis, como descrito por Botteldoorn et al (2003). As amostras superficiais de carcaças, cortes cárneos, equipamentos, utensílios e mãos de manipuladores foram obtidas por meio de *swabs* de áreas de 400 cm<sup>2</sup>, compostos por esfregaço de áreas de 100 cm<sup>2</sup> cada, realizados com esponjas estéreis previamente umedecidas com 10 mL de solução salina peptonada a 0,1% (m/v) cada (Oxoid Ltda., Basingstoke, Inglaterra). Amostras de linguiça foram obtidas de embalagens fechadas.

Os *swabs* coletados das carcaças correspondiam aos animais que pertenciam aos lotes que estavam nas baias de terminação no momento da coleta dos *overshoes*. As

carcaças eram identificadas no início do processo de abate a fim de possibilitar esta correlação ao longo de todos os pontos de amostragem.

Tabela 1. Número de amostras, unidade amostral e pontos de amostragem da coleta na cadeia produtiva de carne suína na região de Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

local	etapa	amostra/fase	un. amostral	n
granja	terminação	piso de baias de terminação	overshoes*	18
frigorífico	abate	carcaça após sangria	400 cm <sup>2</sup>	90
		carcaça após chamuscamento	400 cm <sup>2</sup>	90
		carcaça após evisceração	400 cm <sup>2</sup>	90
		carcação após lavagem	400 cm <sup>2</sup>	90
	processamento	mesa de manipulação (antes das atividades)	400 cm <sup>2</sup>	27
		mesa de manipulação (durante as atividades)	400 cm <sup>2</sup>	27
		faca (antes das atividades)	400 cm <sup>2</sup>	27
		faca (durante as atividades)	400 cm <sup>2</sup>	27
		mãos de manipuladores (antes das atividades)	400 cm <sup>2</sup>	27
		mãos de manipuladores (durante as atividades)	400 cm <sup>2</sup>	27
		corte final embalado	400 cm <sup>2</sup>	54
		embutido embalado	unidade	09

\*Como descrito por Botteldoorn et al. (2003).

As amostras foram acondicionadas em sacos estéreis (Nasco<sup>TM</sup>, Fort Atkinson, WI, EUA) e mantidas em recipientes isotérmicos sob refrigeração até o momento das análises laboratoriais. A Figura 2 especifica os quatro pontos de 100 cm<sup>2</sup> que compuseram os swabs na carcaça após a sangria e após o chamuscamento (A) e na carcaça após evisceração e lavagem (B), sendo 2 pontos no interior da carcaça e dois pontos externos.

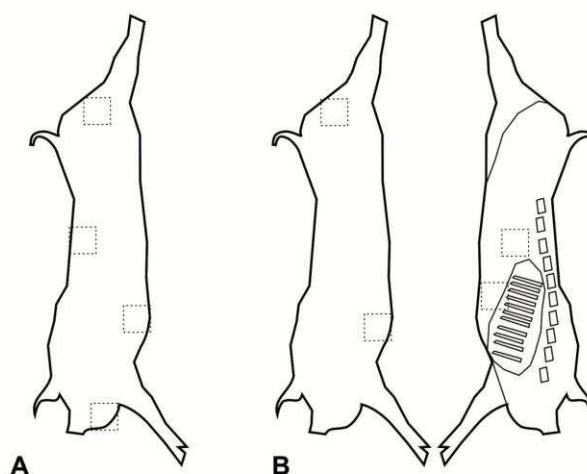


Figura 1. Representação esquemática de carcaça suína antes (A) e após (B) a separação durante o abate, com indicação dos locais amostrados com auxílio de esponjas estéreis em áreas delimitadas em 100 cm<sup>2</sup> (quadrados pontilhados).

## **2.2. Enumeração de *Staphylococcus coagulase positiva***

A enumeração de *Staphylococcus coagulase positiva* (SCP) foi realizada conforme protocolo ISO 6888-2 (ISO, 1999). As amostras superficiais obtidas foram diluídas em escala seriada decimal em solução salina peptonada a 0,1% (m/v) (Oxoid); porções de 25 g das amostras de linguiça foram transferidas para sacos estéreis (Nasco™) e diluídos em 225 mL de solução salina peptonada a 0,1% (m/v) (Oxoid) e então diluídas em escala seriada decimal em solução salina peptonada a 0,1% (m/v) (Oxoid). Em seguida, alíquotas de 0,1 mL de diluições selecionadas das amostras foram semeadas em ágar fibrinogênio plasma de coelho (BioMérieux, Marcy-l'Étoile, França), por espalhamento em superfície. As placas foram incubadas a 37 °C por 48 horas, quando colônias típicas de SCP, com coloração acinzentada, com um halo de fibrina ao seu redor, foram enumeradas. Os resultados obtidos foram expressos em unidades formadoras de colônias (UFC) por cm<sup>2</sup> ou g de SCP, e analisados conforme a relevância dessa contaminação nas diferentes etapas de produção.

As amostras foram agrupadas considerando as contagens obtidas, permitindo a caracterização das etapas da cadeia produtiva de carne suína com maiores frequências de amostras com diferentes contagens de SCP. Adicionalmente, as contagens foram convertidas em log<sub>10</sub> e as médias obtidas foram comparadas por Análise de Variância e teste Tukey para verificação de diferenças significativas entre os diferentes tipos de amostras nas diferentes etapas da cadeia produtiva de carne suína ( $p < 0.05$ ) (XLStat, AddinSoft, New York, NY, EUA).

## **2.3. Pesquisa de *Staphylococcus aureus***

Duas a quatro colônias formadas nas placas foram selecionadas por amostra analisada, purificadas e inoculadas em caldo tripticase de soja (TSB, Oxoid), com

incubação a 37 °C por 24 horas, quando então foram transferidas para microtubos e adicionadas de glicerol a 20% (v/v), para congelamento e utilização em etapas posteriores.

Para caracterização fenotípica de *S. aureus*, os isolados foram caracterizados quanto a produção de catalase, DNase e coloração de Gram (KONEMAN, 2005). Todos os isolados que apresentaram perfil bioquímico compatível com *S. aureus* foram submetidos à reação em cadeia da polimerase (PCR) para confirmação pela detecção do gene *femA*, exclusivo dessa espécie (MEHROTRA et al., 2000).

Alíquotas dos isolados foram semeadas em caldo TSB e incubados a 37 °C overnight. O DNA das culturas foi extraído utilizando o kit *Wizard Genomic DNA Purification* (Promega Corporation, Madison, USA). Os primers utilizados para detecção do gene *femA* estão descritos na Tabela 2, e o protocolo utilizado foi o descrito por Dias et al. (2011).

Tabela 2. Genes pesquisados, sequências de nucleotídeos dos primers e características das reações de PCR utilizadas para identificação de *S. aureus* e definição do perfil de resistência a antibióticos em isolados de *Staphylococcus coagulase* positiva obtidos na cadeia produtiva de carne suína

Gene	Sequência	Produto (pb)	Desnaturação	Anelamento	Extensão	Referência
<i>femA</i>	F - AAAAAAGCACATAACAAGCG R - GATAAAGAAGAAACCAGCAG	132	95°C, 30 s	53°C, 30 s	72°C, 30 s <sup>1</sup>	Dias et al., 2011
<i>femB</i>	F - TTA CAG AGT TAA CTG TTA CC R - ATA CAA ATC CAG CAC GCT CT	651	95°C, 30 s	53°C, 30 s	72°C, 150 s <sup>2</sup>	Pérez-Roth, 2001
<i>mecA</i>	F - AGT TCT GCA GTA CCG GAT TTG C R - AAA ATC GAT GGT AAA GGT TGG C	533	95°C, 30 s	52°C, 30 s	72°C, 60 s <sup>3</sup>	Lee, 2003 (mod.)
<i>vanA</i>	F - ATG GCA AGT CAG GTG AAG ATG G R - TCC ACC TCG CCA ACA ACT AAC G	399	94°C, 25 s	52°C, 40 s	72°C, 50 s <sup>4</sup>	Woodford et al., 1993
<i>blaZ</i>	F - AGAGATTTGCCTATGCTTC R - CTTGACCACTTTTATCAGC	516	94°C, 60 s	54°C, 60 s	72°C, 60 s <sup>5</sup>	Vesterholm-Nielsen et al., 1999
<i>mecC</i>	F - GAAAAAAGGCTTAGAACGCCTC R - GAAGATCTTTTCCGTTTTTCAGC	138	94°C, 60 s	54°C, 60 s	72°C, 60 s <sup>5</sup>	Vesterholm-Nielsen et al., 1999
<i>tetK</i>	F – GTAGCGACAATAGGTAATAGT R – GTAGTGACAATAACCTCCTA	360	94°C, 30 s	55°C, 30 s	72°C, 30 s <sup>6</sup>	Strommenger et al., 2003

<sup>1</sup> PCR com desnaturação inicial de 95°C por 5 minutos, 35 ciclos de desnaturação, anelamento e extensão, extensão final foi feita a 72°C por 5 minutos

<sup>2</sup> PCR com desnaturação inicial de 95°C por 5 minutos, 35 ciclos de desnaturação, anelamento e extensão, extensão final foi feita a 72°C por 5 minutos

<sup>3</sup> PCR com desnaturação inicial de 95°C por 5 minutos, 40 ciclos de desnaturação, anelamento e extensão, extensão final foi feita a 72°C por 10 minutos

<sup>4</sup> PCR com desnaturação inicial de 94°C por 5 minutos, 30 ciclos de desnaturação, anelamento e extensão, extensão final foi feita a 72°C por 10 minutos

<sup>5</sup> PCR com desnaturação inicial de 94°C por 7 minutos, 40 ciclos de desnaturação, anelamento e extensão, extensão final foi feita a 72°C por 7 minutos

<sup>6</sup> PCR com desnaturação inicial de 94°C por 3 minutos, 30 ciclos de desnaturação, anelamento e extensão, extensão final foi feita a 72°C por 30 segundos.

#### 2.4. Resistência a antimicrobianos

Todos os isolados identificados como *S. aureus* foram avaliados quanto à resistência a diferentes antibióticos, pelo teste de susceptibilidade na concentração do breakpoint (BAE et al., 2005). Essa metodologia permite a análise simultânea de diferentes isolados, considerando uma concentração fixa do antibiótico avaliado, determinada de acordo com os limites de resistência estabelecidos pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2016).

Alíquotas dos isolados foram transferidas para caldo tripticase de soja (TSB, Oxoid), com incubação a 37 °C por 24h. Posteriormente, alíquotas de 20 µL das culturas obtidas foram transferidas individualmente para um dos poços de uma placa de microtitulação (96 poços), contendo previamente caldo TSB (180 µl por poço). Em cada placa de microtitulação, um poço foi reservado para inoculação de caldo TSB (controle de contaminação), e um poço para inoculação de um isolado previamente descrito como sensível ao antibiótico a ser testado (controle negativo). Como controle positivo foi utilizado a cepa *S. aureus* ATCC 29213, conforme recomendações do CLSI (2016). A placa de microtitulação foi incubada a 37°C por 24 horas.

Em paralelo, foram preparadas placas de petri com 150 mm de diâmetro contendo agar Mueller-Hinton (BD) suplementado com diferentes antibióticos em diferentes concentrações, conforme descrito na Tabela 3. Após um período de incubação de 24 horas, com o auxílio de um replicador de placas (pin-replicator), as culturas obtidas nas placas de microtitulação foram transferidas para as placas de petri preparadas com os antibióticos, e incubadas a 37 °C por 24 e 48 horas. O crescimento bacteriano no local inoculado indica resistência do isolado em questão ao antibiótico testado. Assim, os isolados foram classificados como resistentes ou sensíveis aos diferentes antibióticos avaliados.

Todos os testes foram realizados em duplicata e uma placa com ágar Mueller-Hinton sem antibiótico foi utilizada para verificação da viabilidade das cepas avaliadas.

Tabela 3. Antibióticos e as concentrações utilizadas em ensaios de identificação de resistência por isolados de *Staphylococcus aureus* obtidos em cadeia produtiva de carne suína por meio da metodologia do breakpoint (BAE et al, 2005).

Classe	Antimicrobiano	concentração
Penicilinas	oxacilina (metecilina)	4 µg/mL
	Penicilina	0,250 ug/mL
glicopeptídeos	Vancomicina	16 µg/mL
tetraciclina	Tetraciclina	16 µg/mL
macrolídeos	Eritromicina	8 µg/mL
aminoglicosídeos	Gentamicina	16 µg/mL
sulfonamidas	Sulfamethoxazole	16 µg/mL
Fenicolis	Cloranfenicol	32 µg/mL
ansamicinas	Rifampicina	4 µg/mL
lincosamidas	Clindamicina	4 µg/mL
Quinolonas	Ciprofloxacina	4 µg/mL

Obs.: classe, antimicrobianos e concentrações definidas de acordo com o CLSI (2016).

O teste de susceptibilidade do breakpoint foi comparado à metodologia de avaliação da concentração mínima inibitória (CLSI, 2016) considerando 10 isolados identificados como *S. aureus* e selecionados aleatoriamente, conforme descrito no Anexo.

Adicionalmente, os mesmos isolados foram submetidos à PCR para detecção de genes associados a resistência a antibióticos. O perfil de resistência das cepas foi verificado a partir da pesquisa dos seguintes genes: *femB*, *blaZ*, *mecA*, *mecC*, *vanA*, *tetK* (Tabela 2). Todas as reações de PCR foram realizadas com o volume final de 25 µL, composto por 12,5 µL do Gotaq Green Master Mix (Promega), 0,50 µL de cada primer (200 nMol), 9,5 µL de água nuclease free e 2 µL de DNA da amostra (concentração mínima: 40 ng/µL). O tampão de corrida utilizado foi o Tris-borato-EDTA gel (TBE) a 0,5X em gel de agarose a 2 % a correr a 100 volts durante 90 minutos. Como marcador molecular foi utilizado 100 bp (Promega). O gel de eletroforese foi corado com GelRed (Biotium, Inc., Fremont, CA, EUA) e fotografado usando o programa Image LPix através

do aparelho de Biotecnologia Locus L.PixR Imagem Molecular. Como marcador do peso molecular, foi utilizado o geneRuler 100 bp DNA ladder (Promega).

### **3. Resultados e Discussão**

#### ***3.1. Enumeração de *Staphylococcus coagulase positiva****

De um total de 603 amostras coletadas, 197 (32,67%) apresentaram alguma contagem de SCP (Tabela 4). 84,9% (512 amostras) das amostras apresentaram contaminação inferior a 2 log de UFC/cm<sup>2</sup> ou g, sendo que destas 512 amostras, 406 (67,3%) apresentaram contagem inferior ao limite de detecção da metodologia. Um total de 52 (26,4%) amostras apresentou contagens de SCP entre 2 e 3 logs UFC/mL ou g, 6 (3,0%) entre 3 e 4 logs UFC/mL ou g, 8 (4,1%) entre 4 e 5 logs UFC/mL ou g e 25 (12,7%) com contagens superiores a 5 log UFC/mL ou g (Tabela 4).

As baias de terminação apresentaram maior variação no nível de contaminação por SCP: 42,9% das amostras apresentaram contagem entre 4 e 5 logs UFC/cm<sup>2</sup> e 50% contagens superiores a 5 logs UFC/cm<sup>2</sup> (Tabela 4). Dentre os pontos de amostragem, a faca durante o processamento, a costela e a paleta foram os que apresentarem menores contagens de SCP (Tabela 4). Todos os pontos apresentaram, em pelo menos uma coleta, alguma contaminação por SCP. A frequência de contaminação variou entre os diversos pontos de amostragem, sendo a frequência de SCP nos produtos finais inferior aos demais pontos (Tabela 4).

Baias de terminação e linguiças foram as amostras que apresentaram maiores frequências de contaminação por SCP: 77,8% das amostras das baias apresentaram contaminação por SCP e em 100% das amostras de linguiças foi possível a enumeração de SCP (Tabela 4). A frequência de contaminação por SCP em linguiças foi superior à

encontrada por Bernardo (2016), que analisou 43 linguiças frescas de suínos, das quais apenas 4,7% apresentaram SCP.

A maioria das amostras das carcaças apresentaram faixa de contaminação por SCP inferior a 2 log UFC/cm<sup>2</sup> (Tabela 4). Lima et al. (2004) avaliou a presença de SCP na superfície de carcaças suínas em diferentes etapas do abate de 120 suínos em Minas Gerais e todas as amostras apresentaram contagens entre 1,56 e 1,70 log UFC/cm<sup>2</sup>. Mesmo em baixas contagens, essas contaminações não podem ser desconsideradas, pois em etapas posteriores pode ocorrer a multiplicação. Ainda, a transferência de genes de resistência para outros micro-organismos pode ocorrer mesmo quando micro-organismos estão em baixas concentrações.

A contaminação das carcaças após a sangria indica que as condições microbiológicas das mesmas dependem de uma série de fatores que vão desde a granja até o abatedouro: condições de limpeza da granja, dos caminhões, das pocilgas de espera, além da eficiência da lavagem dos suínos antes da insensibilização. Falhas nestes processos favorecem a disseminação de patógenos e micro-organismos indicadores de higiene dentro do frigorífico e propiciam a contaminação cruzada (BUNCIC & SOFOS, 2012).

Carcaças amostradas após o chamuscamento e polimento apresentaram um aumento das taxas de contaminação quando comparado à etapa anterior, constituindo em uma etapa crítica (Tabela 4). O túnel onde ocorre o polimento pode ser capaz de efetuar uma contaminação cruzada caso não seja bem higienizado e não haja uma circulação de água adequada.

As faixas de contaminação por SCP nas carcaças suínas após chamuscamento e após evisceração foram similares (Tabela 4). Lima et al. (2004) também não encontraram diferenças significativas nas faixas de contaminação por SCP e *S. aureus* em carcaças

suínas amostradas após as etapas de escaldagem/depilação e imediatamente antes da evisceração.

As mãos durante o processamento apresentaram menores frequências de contaminação por SCP do que as mãos limpas (Tabela 4). Isso também aconteceu com as mesas e facas (Tabela 4). Esses resultados indicam que a higienização não é feita de forma eficiente. Bresolin et al. (2005) isolou *S. aureus* das mãos de 34,4% dos manipuladores durante o processamento e observou que o procedimento de higienização das mãos não é capaz de eliminar toda a carga bacteriana, o que promove uma contaminação cruzada dentro da indústria de alimentos.

Tabela 4. Faixas de contaminação e frequência de *Staphylococcus* coagulase positiva (SCP) em amostras obtidas na cadeia produtiva de carne suína.

local	etapa	amostra	n	faixas de contaminação (log UFC/cm <sup>2</sup> ou g)					SCP n (%)
				< 2	2-3	3-4	4-5	>5	
granja frigorífico	terminação	baia de terminação	18	4	0	1	6	7	14 (77.8)
	abate	carcaça após sangria	90	72	16	2	0	0	25 (27.8)
		carcaça após chamuscamento	90	85	5	0	0	0	35 (38.9)
		carcaça após evisceração	90	78	4	0	0	8	34 (37.8)
		carcação após lavagem	90	78	9	1	0	2	28 (31.1)
		processamento	faca limpa	27	23	0	0	0	4
	faca durante processamento		27	27	0	0	0	0	2 (7.4)
	mãos limpas		27	24	3	0	0	0	11 (40.7)
	mãos durante processamento		27	24	3	0	0	0	6 (22.2)
	mesa limpa		27	21	3	0	0	3	9 (33.3)
	produtos finais	mesa durante processamento	27	24	1	2	0	0	8 (29.6)
		Costela	18	17	0	0	0	1	1 (5.6)
		Paleta	18	18	0	0	0	0	1 (5.6)
		Pernil	18	16	2	0	0	0	2 (11.1)
			linguiça	9	1	6	0	2	0
total			603	512	52	6	8	25	197 (32.7)

Masson (2012) obteve SCP em 2,8% das suas amostras de pernil, ocorrência inferior à encontrada neste estudo (11,1%, Tabela 4). Este pesquisador também avaliou utensílios e o ambiente da desossa durante o processamento e seus achados foram inferiores aos obtidos no presente estudo: 2,8% de SCP contra 19,8 % (faca, mãos e mesa durante processamento, Tabela 4).

Ao contrário do esperado, nem todas as amostras de baia de terminação apresentaram contagem de SCP (Tabela 4), apesar desse grupo de bactérias estar naturalmente presente nos suínos. Linguiças foram as únicas amostras que apresentaram contaminação por SCP em todas as coletas (Tabela 4). De certa forma, esse resultado pode ser considerado como esperado, uma vez que a produção de linguiça demanda grande manipulação, além de não ser submetida a nenhum tratamento térmico (MILANI, 2003).

As médias das contagens de SCP obtidas em diferentes etapas da cadeia produtiva de carne suína e amostras são apresentadas na Figura 2: amostras que apresentaram contagens abaixo e acima dos limites de detecção da metodologia utilizada não foram consideradas nessa análise. Os gráficos demonstram que houve diferença significativa entre as contagens de SCP apenas em carcaças de suínos após a sangria quando comparadas as contagens obtidas nas demais etapas do abate ( $p < 0,05$ ). Esses resultados indicam que a escaldagem e chamuscamento são importantes pontos de controle microbiológico e impactam na qualidade da carne, caso não haja falha de processo em etapas posteriores. No entanto, se os equipamentos envolvidos nestas etapas não forem bem higienizados podem ser responsáveis por recontaminar as carcaças e promover contaminação cruzada. As carcaças de suínos amostradas após o chamuscamento apresentaram menores contagens de SCP quando comparadas a etapa anterior do abate (Figura 2), porém apresentaram maiores frequências de amostras com contagens de SCP (Tabela 4), indicando um importante ponto de contaminação na cadeia.

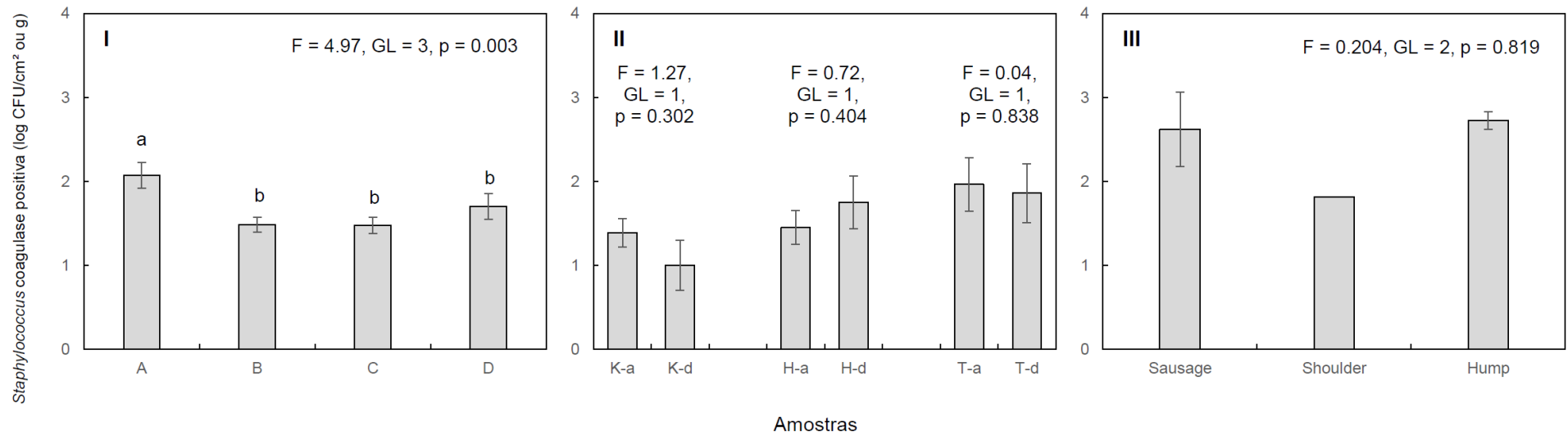


Figura 2. Médias de contagens de *Staphylococcus coagulase positiva* ( $\pm$  erro padrão) em amostras obtidas em frigorífico de carne suína. I) Abate: A: carcaça após sangria, B: carcaça após chamuscamento, C: carcaça após evisceração, D: carcaça após lavagem; II) Ambiente de processamento: K-a: faca limpa, K-d: faca durante processamento, H-a: mãos limpas, H-d: mãos durante processamento, T-a: mesa limpa, T-d: mesa durante processamento; III) Produtos finais: Sausage: linguiça, Shoulder: paleta, Hump: pernil. Em cada gráfico: F: anova, GL: graus de liberdade, p: nível de significância.

Nas demais etapas da cadeia produtiva da carne suína não foram observadas diferenças significativas entre as contagens de SCP obtidas nas amostras analisadas ( $p > 0,05$ , Figura 2). Apesar da presença de SCP em todas as amostras de linguiça, a contagem média não foi superior quando comparada as médias obtidas nos demais produtos finais ( $p > 0,05$ , Figura 2).

A ausência de diferenças significativas entre as médias de SCP de amostras obtidas no ambiente de processamento indica que a higienização feita nas mãos, mesas e facas não foi capaz de eliminar SCP. As médias das contagens de SCP nos produtos acabados foram superiores às médias observadas em equipamentos, utensílios e manipuladores, assim como às médias observadas em carcaças, indicando aumento da carga de SCP durante o processamento dos cortes cárneos (Figura 2). Esses resultados indicam que embora os procedimentos de higienização e refrigeração aparentemente determinem redução nas frequências de contaminação, ainda há possibilidade de multiplicação de SCP presentes nos produtos finais ou mesmo recontaminação.

### **3.2. Pesquisa de *Staphylococcus aureus***

Considerando as amostras que permitiram contagens de SCP, 315 colônias foram selecionadas (aproximadamente 2 a 3 por amostra analisada), purificadas e confirmadas como SCP por meios de testes bioquímicos (coloração de gram, prova da catalase e prova da DNase). Desses isolados, 246 foram identificados como *S. aureus*. Em estudo similar, Masson (2012) coletou 458 amostras na cadeia produtiva de suínos e isolou 103 SCP, dos quais 81 (79%) foram identificados como *S. aureus* pela detecção do gene *femA*.

Considerando os 25 isolados de SCP obtidos em baias de terminação, 18 (72,0%) foram identificados como *S. aureus*. De um total de 189 isolados SCP das carcaças, 147 (77,7%) apresentaram o gene *femA*. Considerando especificamente os isolados obtidos

nas carcaças após a evisceração, 37,5% foram identificados como *S. aureus*, resultado similar ao observado por Tanih et al (2015), que encontrou 31,6% de prevalência na mesma etapa de abate.

Considerando os isolados obtidos de amostras coletadas no ambiente de processamento, 63 de 79 (79,7%) foram identificados como *S. aureus*. Já dos 22 isolados obtidos dos produtos finais, 18 (81,8%) foram confirmados como *S. aureus*. Este aumento na ocorrência de *S. aureus* ao longo da cadeia produtiva de carne suína sugere que esta espécie seja mais resistente e/ou mais adaptada que as demais espécies bacterianas, sendo capaz de driblar os diversos pontos de controle microbiológico.

A frequência de *S. aureus* nas carnes suínas cruas (costela, paleta e pernil) foi de 5,6%, inferiores às frequências observadas por De Boer et al. (2009), que verificaram que 10,7% das suas amostras de carnes cruas foram positivas para essa espécie bacteriana. Um estudo nos Estados Unidos, também com carnes cruas de suínos disponíveis no varejo, apresentou taxa de prevalência de 19,4% (HANSON et al., 2011).

A frequência de *S. aureus* nas amostras coletadas foi de 28% (166 amostras), sendo a frequência de *S. aureus* nas carcaças de 17%. Lima et al. (2004) observaram que 11,7% das carcaças de suínos amostradas estavam contaminadas com *S. aureus*. Assim como observado por Lima et al. (2004), o aumento da frequência de *S. aureus* em carcaças indica possíveis falhas higiênicas durante as diferentes etapas do abate e/ou por utensílios e equipamentos contaminados.

Considerando os isolados obtidos de baias de terminação, 61% foram identificados como *S. aureus*, assim como 78% dos isolados obtidos de linguiça. A frequência de *S. aureus* nas facas e mãos limpas foram superiores às das facas e mãos durante o processamento, o que reforça a hipótese de que *S. aureus* que sobrevivem na linha de abate são mais resistentes nos ambientes de processamento.

As amostras de costela, paleta e pernil apresentaram baixa frequência de contaminação por *S. aureus* (5,6%, 5,6% e 11%, respectivamente), fato este que pode ser justificado pelo processo de refrigeração rápida pelo qual passa a carcaça antes de ser processada, que inibe a multiplicação desse patógeno em temperaturas baixas. Esses achados foram inferiores aos encontrados por Scharft et al. (1992) em seu experimento com pernis suínos, onde 33,6% das amostras foram positivas para *S. aureus*.

### **3.3. Resistência a antimicrobianos**

Os antibióticos que apresentaram maiores frequências de resistência pelos isolados de *S. aureus*, foram sulfamethoxazole, ciprofloxacina e penicilina, em suas concentrações mínimas inibitórias, conforme apresentado na Tabela 5. As frequências de resultados positivos para os genes relacionados a resistência a diferentes antibióticos também são apresentadas na Tabela 5.

A frequência de *S. aureus* resistentes a metilina (MRSA) foi de 40,2% (Tabela 5), similar a observada em estudos similares na Europa. De Neeling et al. (2007) encontraram uma prevalência de 39% de MRSA no trabalho conduzido com 540 suínos na Holanda. Na Alemanha, Tenhagen et al. (2009) obtiveram, a partir de swabs nasais, 49% de MRSA. Na Tabela 5 é possível a identificação do número de isolados de MRSA por ponto de amostragem.

Crombé et al. (2011), em pesquisa com 1.500 suínos na Bélgica, observaram uma prevalência de 44% de MRSA nas granjas estudadas. Em nosso estudo, encontramos 55,5% de cepas isoladas das granjas resistentes à oxacilina (Tabela 5). Em uma pesquisa realizada nos Estados Unidos por Smith et al. (2009), 49% dos suínos amostrados apresentaram MRSA. Em concordância com o estudo de Crombé et al. (2011), todas as cepas MRSA foram também resistentes à tetraciclina (Tabela 5).

Tabela 5. Frequência de resistência a diferentes antimicrobianos e presença de genes relacionados a resistência a diferentes antimicrobianos em isolados de *Staphylococcus aureus* (*femA* positivos) obtidos em diferentes etapas da cadeia produtiva de carne suína na região de Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

local	etapa	amostra	n	resistência a antimicrobiano (breakpoint)											genes					
				OXA	PEN	VAN	GEN	ERI	TET	CIP	CLI	SUL	CLO	RIF	<i>femB</i>	<i>mecA</i>	<i>mecC</i>	<i>blaZ</i>	<i>vanA</i>	<i>tetK</i>
granja frigorífico	terminação	baia de terminação	18	10	14	4	1	9	12	13	13	16	9	11	1	0	0	10	0	0
	abate	carcaça após sangria	24	9	17	7	1	14	9	20	11	21	8	6	2	0	0	18	0	1
carcaça após chamuscamento		42	9	18	6	8	19	3	35	7	35	6	7	2	0	0	28	0	1	
carcaça após evisceração		40	15	27	5	0	23	5	38	16	38	7	4	3	0	0	30	0	0	
carcação após lavagem		41	6	27	4	2	23	3	37	5	35	3	5	7	0	0	38	0	1	
processamento		facas limpas	16	13	14	3	2	8	3	16	13	16	10	9	1	0	0	11	0	0
		facas durante processamento	3	3	3	0	0	0	0	3	3	3	2	2	0	0	0	3	0	0
		mãos limpas	17	13	15	3	0	6	4	17	13	17	8	8	0	0	0	9	0	1
		mãos durante processamento	8	7	6	0	1	2	2	4	6	8	6	6	0	0	0	6	0	1
		mesa limpa	9	4	7	3	0	5	3	9	4	9	5	4	0	0	0	5	0	0
		mesa durante processamento	10	1	6	1	0	8	1	10	1	10	1	3	0	0	0	10	0	0
cortes		costela	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0
		paleta	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		pernil	4	1	2	1	0	1	1	3	1	2	1	0	0	0	0	4	0	0
		linguiça	13	8	10	3	1	3	6	8	6	12	4	7	4	0	0	9	0	4
total			246	99	167	40	16	122	52	214	99	223	70	72	20	0	0	182	0	9

\* OXA: Oxacilina (metecilina), PEN: Penicilina, VAN: Vancomicina, GEN: Gentamicina, ERI: Eritromicina, TET: Tetraciclina, CIP: Ciprofloxacina, CLI: Clindamicina, SUL: Sulfametoxazole, CLO: Cloranfenicol, RIF: Rifampicina.

Dos 18 isolados de baias de terminação, 10 caracterizaram-se como MRSA (55,6%). Esta alta frequência pode ser reflexo do uso de antibióticos promotores de crescimento na criação dos suínos. Os isolados das carcaças apresentaram uma frequência média de 28% de MRSA. Durante o abate, a frequência de MRSA observada após a escaldagem e chamuscamento é inferior a observada após a sangria, indicando que esses procedimentos conseguem reduzir essa contaminação por MRSA; entretanto, há aumento da frequência de MRSA nas carcaças suínas após a etapa de evisceração e nova redução após a lavagem (Tabela 5).

Esses resultados indicam a ocorrência de uma contaminação cruzada por MRSA dentro da linha de abate, que acaba por ser reduzida etapa de lavagem final das carcaças (Tabela 5). As amostras ambientais do processamento (mesa, mãos e facas limpas e durante o processamento) apresentaram altas frequências de MRSA, superiores às carcaças, com exceção da mesa durante o processamento (10% de MRSA) o que pode ser justificado pela contaminação desses ambientes por manipuladores e não pelas carcaças. O único isolado obtido de costela não foi caracterizado como MRSA, e 25% dos isolados oriundos de pernis eram MRSA. Já 61,5% das amostras de linguça apresentaram resistência fenotípica à oxacilina (Tabela 5).

Dentre os isolados de *S. aureus*, 182 apresentaram o gene *blaZ*, responsável pela produção de penicilases, 20 (8%) apresentaram *femB* e 9 (4%) apresentaram *tetK*. Nenhum dos 315 isolados apresentou resultado positivo para os genes *mecA*, *mecC* e *vanA* (Tabela 5). Tiwari & Sen (2006) em sua pesquisa com *S. aureus* resistentes à vancomicina, encontraram resistência fenotípica à droga, porém não encontram os genes *vanA* e *vanB* em nenhum isolado. O gene *vanA* é um gene plasmidial, que originalmente foi transferido de um *Enterococcus faecalis* para cepas MRSA, confere resistência à vancomicina por um mecanismo ainda desconhecido (MIMICA et al., 2006).

A ausência do gene *mecA* em cepas fenotipicamente resistentes à meticilina também já foi observada por outros pesquisadores. Bagcigil et al. (2007) não encontraram o gene *mecA* em animais resistentes em seu estudo com 100 suínos. Isto pode ser explicado pela existência de inúmeros genes ligados à expressão da resistência à oxacilina. Masson (2012), pesquisou o gene *mecA* em suas 81 amostras de *S. aureus* nenhuma apresentou o gene *mecA*, apesar de 4 isolados terem sido fenotipicamente resistentes à oxacilina. O gene *mecA*, localizado no cromossomo, só está presente em cepas resistentes a meticilina (MRSA) e é responsável pela produção de PBP2a, proteína da parede celular que confere resistência à meticilina.

O gene *femB*, além de ser exclusivo de *S. aureus*, codifica um fator essencial para a resistência à meticilina (PÉREZ-ROTH et al., 2001). Já o gene plasmidial *blaZ* codifica penicilases que inativam a penicilina, conferindo resistência (HACKBARTH & CHAMBERS, 1993). O gene *mecC* também codifica proteínas de membrana que permitem a formação do peptidoglicano, conferindo resistência. O gene plasmidial *tetK* confere resistência às tetraciclinas, antimicrobianos de amplo espectro de ação, cuja a existência de cepas resistentes já foi relatada (ULLAH et al., 2012).

Os isolados de *S. aureus* apresentaram alta frequência de multi-resistência (Tabela 6). Considerando os antimicrobianos avaliados, foram observadas 68 combinações de resultados, sendo a oxacilina presente em 50% (34) delas. Combré et al (2001) encontrou 48 diferentes perfis de resistência para as cepas MRSA. Apenas 15 (6%) isolados de *S. aureus* não apresentaram resistência a nenhum dos antibióticos testados e 91,05% (224) dos isolados identificados como *S. aureus* foram multirresistentes. A combinação mais frequente foi a composta por 4 antibióticos: penicilina, eritromicina, ciprofloxacina e sulfamethoxazole. O único isolado de costela identificado como *S. aureus* apresentou resistência a esse grupo de drogas (Tabela 6). A penicilina apareceu compondo 72,05% (49) grupos de resistência fenotípica simultânea.

Tabela 6. Perfil de resistência a diferentes antibióticos por 246 isolados de *Staphylococcus aureus* obtidos da cadeia produtiva de carne suína. Resultados fenotípicos obtidos por teste de susceptibilidade considerando as concentrações indicadas para o breakpoint (CLSI, 2016).

Perfil fenotípico*	n	Origem
10 : OXA-PEN-VAN-ERI-TET-CIP-CLI-SUL-CLO-RIN	11	baia, carcaça (A, B), mesa antes, linguiça
10 : OXA-PEN-VAN-GEN-ERI-TET-CIP-CLI-SUL-CLO	2	baia, carcaça (A)
10 : OXA-PEN-VAN-GEN-ERI-TET-CIP-CLI-SUL-RIN	1	Linguiça
9 : OXA-PEN-ERI-TET-CIP-CLI-SUL-CLO-RIN	5	baia, mãos (antes e durante)
9 : OXA-PEN-VAN-ERI-CIP-CLI-SUL-CLO-RIN	2	carcaça (B), mãos antes
9 : OXA-PEN-VAN-ERI-TET-CIP-CLI-SUL-CLO	5	carcaça (D), faca ante, mesa antes, pernil
9 : OXA-PEN-VAN-ERI-TET-CIP-CLI-SUL-RIN	4	baia, carcaça (B, C)
9 : OXA-PEN-VAN-GEN-CIP-CLI-SUL-CLO-RIN	1	carcaça (B)
9 : OXA-PEN-VAN-TET-CIP-CLI-SUL-CLO-RIN	1	carcaça (A)
8 : OXA-PEN-ERI-CIP-CLI-SUL-CLO-RIN	6	baia, carcaça (B, C), faca antes, mãos antes
8 : OXA-PEN-GEN-CIP-CLI-SUL-CLO-RIN	2	faca antes
8 : OXA-PEN-TET-CIP-CLI-SUL-CLO-RIN	1	faca antes
8 : OXA-PEN-VAN-CIP-CLI-SUL-CLO-RIN	2	carcaça (B, C)
8 : OXA-PEN-VAN-ERI-CIP-CLI-SUL-CLO	2	carcaça (D), faca antes
8 : OXA-PEN-VAN-ERI-TET-CIP-CLI-SUL	1	faca antes
7 : OXA-PEN-CIP-CLI-SUL-CLO-RIN	10	faca (antes e durante), mãos antes, linguiça
7 : OXA-PEN-TET-CIP-CLI-SUL-RIN	2	Baia
7 : OXA-PEN-TET-CLI-SUL-CLO-RIN	2	baia, linguiça
7 : OXA-PEN-VAN-ERI-CIP-CLI-SUL	2	carcaça (B), mãos antes
7 : OXA-PEN-VAN-ERI-CIP-SUL-RIN	1	carcaça (D)
7 : OXA-PEN-VAN-TET-CIP-CLI-SUL	4	carcaça (C), mãos antes, mesa durante
7 : PEN-ERI-TET-CIP-CLI-SUL-CLO	1	carcaça (A)
7 : PEN-ERI-TET-CIP-CLI-SUL-RIN	1	Baia
6 : ERI-TET-CIP-CLI-SUL-CLO	1	Baia
6 : OXA-PEN-CIP-CLI-SUL-CLO	1	carcaça (C)
6 : OXA-PEN-CLI-SUL-CLO-RIN	4	baia, mãos durante

Perfil fenotípico*	n	Origem
6 : OXA-PEN-ERI-CIP-CLI-SUL	1	carcaça (A)
6 : OXA-PEN-GEN-SUL-CLO-RIN	1	mãos durante
6 : OXA-PEN-TET-CIP-CLI-SUL	1	carcaça (A)
6 : OXA-PEN-TET-CIP-SUL-RIN	1	Linguiça
6 : OXA-PEN-VAN-CIP-CLI-SUL	1	mesa antes
6 : PEN-ERI-CIP-SUL-CLO-RIN	2	mesa (antes e durante)
6 : TET-CIP-CLI-SUL-CLO-RIN	1	Baia
5 : ERI-CIP-SUL-CLO-RIN	1	mesa antes
5 : GEN-TET-CIP-SUL-RIN	1	carcaça (B)
5 : OXA-PEN-CIP-CLI-SUL	15	carcaça (C, D), faca (antes e durante), mãos antes, mesa antes, linguiça
5 : OXA-PEN-CIP-SUL-RIN	1	Linguiça
5 : OXA-PEN-GEN-CIP-SUL	1	carcaça (B)
5 : PEN-CIP-SUL-CLO-RIN	1	mesa antes
5 : PEN-ERI-CIP-CLI-SUL	1	carcaça (D)
5 : PEN-ERI-CIP-SUL-CLO	3	carcaça (B, C)
5 : PEN-ERI-CIP-SUL-RIN	3	faca antes, mesa durante
5 : PEN-ERI-TET-CIP-SUL	1	carcaça (C)
4 : ERI-CIP-SUL-CLO	1	carcaça (C)
4 : OXA-CIP-CLI-SUL	3	carcaça (C), mãos durante
4 : OXA-ERI-CIP-SUL	1	carcaça (D)
4 : OXA-PEN-CIP-SUL	1	carcaça (B)
4 : PEN-CIP-SUL-RIN	3	carcaça (D)
4 : PEN-ERI-CIP-SUL	37	baia, carcaça (A, B, C, D), mesa (antes e durante), costela
4 : PEN-GEN-CIP-SUL	3	carcaça (B, D)
4 : PEN-TET-CIP-SUL	1	Baia
3 : CIP-CLI-SUL	1	carcaça (A)
3 : CIP-SUL-RIN	1	carcaça (D)
3 : ERI-CIP-SUL	24	carcaça (A, B, C, D), faca antes, mãos antes, mesa durante

Perfil fenotípico*	n	Origem
3 : GEN-CIP-SUL	2	carcaça (B)
3 : PEN-CIP-SUL	11	carcaça (A, B, C, D), mãos antes, linguiça
3 : PEN-ERI-SUL	1	carcaça (A)
3 : TET-CIP-SUL	2	mãos antes, mesa antes
2 : CIP-SUL	13	carcaça (A, B, C, D), mãos durante, mesa durante, pernil
2 : CLI-CLO	1	carcaça (C)
2 : ERI-CIP	1	carcaça (B)
2 : GEN-CIP	2	carcaça (B)
2 : PEN-CIP	1	Pernil
2 : PEN-SUL	2	baia, linguiça
2 : TET-SUL	1	Linguiça
1 : CIP	2	carcaça (D)
1 : SUL	4	carcaça (B), linguiça
1 : TET	1	carcaça (D)
0 : nenhum	15	baia, carcaça (A, B, C, D), pernil, linguiça

\* número de antimicrobianos, OXA: Oxacilina (meticilina), PEN: Penicilina, VAN: Vancomicina, GEN: Gentamicina, ERI: Eritromicina, TET: Tetraciclina, CIP: Ciprofloxacina, CLI: Clindamicina, SUL: Sulfametoxazole, CLO: Cloranfenicol, RIF: Rifampicina.

Tabela 7. Perfil genotípico por genes associados a resistência a diferentes antibióticos por 246 isolados de *Staphylococcus aureus* obtidos da cadeia produtiva de carne suína.

Perfil genotípico	n	Origem
3 : <i>femB-blaZ-tetK</i>	3	carcaça (D), linguiça
2 : <i>blaZ-tetK</i>	4	carcaça (A, B), linguiça
2 : <i>femB-blaZ</i>	15	carcaça (A, B, C, D), faca antes, linguiça
1 : <i>blaZ</i>	160	baia, carcaça (A, B, C, D), faca (antes e durante), mãos (antes e durante), mesa (antes e durante), costela, pernil, linguiça
1 : <i>femB</i>	2	baia, carcaça (B)
1 : <i>tetK</i>	2	mãos (antes e durante)
0 : nenhum	60	baia, carcaça (A, B, C, D), faca antes, mãos (antes e durante), mesa antes, linguiça

Masson (2012) também encontrou predominância de *S. aureus* multirresistentes em sua pesquisa; os princípios ativos de menor eficiência foram a penicilina, tetraciclina, clindamicina, eritromicina e ciprofloxacina. A resistência à penicilina é bem variável entre alguns países, porém altas frequências de resistência já foram relatadas em estudos na Dinamarca (84%) e na Bélgica (60%) (AARESTRUP et al., 2008).

Os isolados MRSA foram resistentes a um maior número de drogas antimicrobianas do que os demais. Este comportamento que associa a resistência a meticilina à multidrogarresistência também foi observado por Lee (2003).

Ao avaliar o perfil genético de resistência a antibióticos por *S. aureus* (Tabela 7), 60 (24,4%) isolados não apresentaram nenhum dos genes de resistência avaliados, além do *femA*, que é um gene de identificação e supostamente relacionado a resistência. Ainda, 73,98% dos isolados de *S. aureus* apresentaram o gene *blaZ*, e todos os isolados de produtos finais (costela e pernil) apresentaram esse gene (Tabela 7).

Quanto à coincidência entre os testes fenotípicos e genotípicos para determinação da resistência a antibióticos, apenas em relação a penicilina e a presença do *blaZ* foi observada uma correspondência significativa ( $p = 0,147$ , Tabela 8). No teste de susceptibilidade na concentração do breakpoint para a penicilina, 167 cepas de *S. aureus* foram resistentes, e 182 apresentaram o gene *blaZ* (Tabela 5); porém, houve correspondência de resultados em 153 isolados (Tabela 8). Embora existam 2 genes cromossomais reguladores da expressão do *blaZ* (*blaR1* e *blaI*), não é relatado na literatura a existência de outros genes responsáveis pela resistência à penicilina (LOWY, 2003), o que pode justificar a coincidência entre os testes fenotípicos e genotípicos (Tabela 8).

Tabela 8. Comparação de resultados para identificação de resistência a antibióticos por métodos fenotípico e genotípico em 246 isolados de *Staphylococcus aureus* obtidos em cadeia produtiva de carne suína.

antimicrobiano	comparação pareada	resultados coincidentes		resultados divergentes		Q*	P
		positivo	negativo	positivo : negativo	negativo : positivo		
metilina (OXA)	breakpoint : <i>femA</i>	99	0	0	147	145.0	< 0.0001
	breakpoint : <i>femB</i>	4	131	95	16	54.8	< 0.0001
	breakpoint : <i>femA-femB</i>	4	131	95	16	54.8	< 0.0001
	breakpoint : <i>femA e/ou femB</i>	99	0	0	147	145.0	< 0.0001
penicilina (PEN)	breakpoint : <i>blaZ</i>	128	25	39	54	2.11	0.147
vancomicina (VAN)	breakpoint : <i>vanA</i>	0	206	40	0	38.0	< 0.0001
tetraciclina (TET)	breakpoint : <i>tetK</i>	3	188	49	6	32.1	< 0.0001

\* McNemar; valores de P inferiores a 0.05 indicam diferenças significativas entre os testes comparados (fenotípico vs genotípico).

Em 99 isolados foi possível a verificação de resistência fenotípica a oxacilina e presença de genes associados a esse perfil de resistência (*femA* e/ou *femB*), porém 147 apresentaram os genes, sem expressão do perfil de resistência (Tabela 8). *femB* foi detectado em apenas 4 *S. aureus* fenotipicamente resistentes, e foram verificados isolados resistentes pelo breakpoint que não possuíam o gene (Tabela 8). Esses resultados demonstram a grande heterogeneidade e variedade genética envolvida na expressão fenotípica da resistência a meticilina. Em estudo anterior que pesquisou os genes *femB* e *mecA* associados a avaliação fenotípica da resistência, foi verificada a presença de cepas sensíveis a meticilina que possuíam o gene *femB*, e *mecA* somente foi detectado em cepas resistentes a altas concentrações de meticilina (PÉREZ-ROTH et al., 2001).

Apesar do gene *mecA* ser o principal fator de resistência à meticilina, existem elementos reguladores, como o *mecRI-mecI*, capazes de permitir ou não a expressão de genes de resistência, mas que não estão necessariamente presentes em todas as cepas que possuem *mecA*. Os genes *femA* e *femB* ocorrem naturalmente em *S. aureus*, tanto em cepas resistentes como em susceptíveis e são essenciais para a determinação da resistência, além do *mec* (HURLIMANN-DALEL et al, 1992). Hurlimann-Dalel et al. (1992), em estudo com cepas de *S. aureus* resistentes e sensíveis a meticina, observaram que haviam cepas fenotipicamente resistentes à meticilina que possuem o *mecA*, mas não possuíam o elemento *mecRI-mecI*, outras que possuíam e também não eram sensíveis. No entanto, o *femA* esteve presente em todos os isolados fenotipicamente resistentes.

Em complementação, o gene *mecC*, homólogo ao *mecA*, também implica em resistência a meticilina (STEGGER, 2011). Ainda, a existência de outros genes chamados fatores essenciais para a resistência a meticilina (*fem*), além do *femA* e *femB*, como o *femC*, *femD*, *femE*, *femF*, que estão presentes em cepas susceptíveis e resistentes, dificulta ainda mais a classificação genotípica das cepas (CHAMBERS, 1997).

Em relação a tetraciclina, 52 isolados foram fenotipicamente resistentes, porém apenas 9 possuíam o gene *tetK* (Tabela 5), dentre as quais apenas 3 foram fenotipicamente resistentes a tetraciclina (Tabela 8). A codificação da resistência à tetraciclina pode ser feita por outros genes isolados ou em associação com o gene *tetK*, como, por exemplo os genes *tetM* e *tetL* (ARGUDÍN et al., 2011).

A pesquisa do gene *vanA* demonstrou que este não é o único responsável pela resistência à vancomicina. Das 246 cepas de *S. aureus*, nenhuma apresentou o gene *vanA* apesar de 40 serem resistentes à vancomicina pelo método do breakpoint (Tabela 5). O mecanismo exato da resistência ainda é desconhecido, mas há indícios de que isso ocorre por meio do espessamento da parede celular, o que dificulta e impede que a vancomicina alcance a membrana citoplasmática onde acontece a síntese de peptidoglicano (CUI et al, 2000; TIWARI & SEN, 2006). Tiwari & Sen (2006) não encontraram os genes *vanA* e *vanB* em cepas fenotipicamente resistentes à vancomicina. Hoje já se tem relato de resistência à vancomicina em virtude da presença do gene *vanC* (MIRANI & JAMIL, 2013).

#### **4. Conclusões**

Esse trabalho revelou a ocorrência de SCP e *S. aureus* ao longo de toda a cadeia produtiva de suínos, o que reforça a importância de controles de qualidade eficientes dentro da indústria de alimentos, a fim de reduzir a contagem de *Staphylococcus aureus* para níveis aceitáveis. Adicionalmente, pode ser verificada a disseminação de cepas de *S. aureus* resistentes a diferentes antibióticos, alertando para a necessidade de um controle e monitoramento eficaz em diferentes etapas da cadeia produtiva a fim de evitar de se a permanência de cepas multidrogaresistentes ao longo da cadeia produtiva. Finalmente, foi evidente a necessidade de associação de testes fenotípicos e genotípicos para

caracterizar adequadamente o perfil de resistência de *S. aureus* presentes na cadeia produtiva de carne suína.

## Agradecimentos

CNPq, CAPES e FAPEMIG.

## Referências Bibliográficas

- AARESTRUP, F.; M.; DURAN, C.; O.; BURCH, G. S. Antimicrobial resistance in swine production. **Animal Health Research Reviews**, Cambridge, v. 9, n.2, p. 135-148, 2008.
- ABPA, Associação Brasileira de Proteína Animal. **Cenário Carnes 2014/2015**, São Paulo, SP. 2015.
- ARGUDIN, M.A.; TENHAGEN, A.; FETSCH, J.; SACHSENRODER, A.; KASBOHRER, A.; SCHROETER, J.A.; HAMMERL, S.; HERTWIG, R.; HELMUTH, R.; BRÄUNIG, J.; MENDOZA, M.C.; APPEL, B.; RODICIO, M.R.; GUERRA, B. Virulence and resistance determinants of German *Staphylococcus aureus* ST398 isolates from nonhuman sources. **Applied and Environmental Microbiology**, v.77, n. 9, p.3052–3060, 2011.
- AMARAL, A. L.; SILVEIRA, P. R. S.; LIMA, G. J. M. M.; et al. Boas práticas de produção de suínos. **Circular Técnica - Embrapa Suínos e Aves**, v. 50, p. 1–60, 2006.
- BAE, W.; KAYA, K. N.; HANCOCK, D. D.; et al. Prevalence and antimicrobial resistance of thermophilic *Campylobacter* spp. from cattle farms in Washington State. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 1, p. 169–174, 2005.
- BAGCIGIL, F.A.; MOODLEY, A.; BAPTISTE, K.E.; JENSEN, V.F.; GUARDABASSI, L. Occurrence, species distribution, antimicrobial resistance and clonality of methicilin and erythromycin-resistant staphylococci in nasal cavity of domestic animals. **Veterinary Microbiology**, v.121, p.307-315, 2007.
- BERNARDO, L.G.; GEORGES, S.O.; BORGES, L.J.; ANDRÉ, M.C.D.P.B. *Staphylococcus aureus* Isolados de Linguiças Suínas e de Frango do Tipo Frescal: Antibiograma e Tipificação Microbiana. **Anais do 12º Congresso Latinoamericano de Microbiologia e Higiene de Alimentos**, v. 1, n. 1, p. 265-266, 2014
- BOTTELDOORN, N.; HEYNDRIKX, M.; RIJSENS, N.; GRIJSPEERDT, K.; HERMAN, L. *Salmonella* on pig carcasses: positive pigs and cross contamination in the slaughterhouse. **Journal of Applied Microbiology**, n.95, p. 891-903,2003.
- BRESOLIN, B.M.Z.; DALL’STELLA, J.K.; SILVA, S.E.F. Pesquisa sobre *Staphylococcus aureus* na mucosa nasal e mãos de manipuladores de alimentos em Curitiba, Paraná, Brasil. **Estudos de Biologia.**, v. 27, n. 59, p.27-32, 2005.

- BUNCIC, S.; SOFOS, J. Interventions to control *Salmonella* contamination during poultry, cattle and pig slaughter. **Food Research International**, v. 45, n. 2, p. 641–655, 2012.
- CHAMBERS, H.F. Methicillin Resistance in Staphylococci: Molecular and Biochemical Basis and Clinical Implications. **Clinical Microbiology Reviews**, v.10, n. 4, p. 781-791, 1997.
- CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-six informational supplement. CLSI document M100-S26. Wayne, PA: **Clinical and Laboratory Standards Institute**; 2016
- CROMBÉ, F.; WILLEMS G.; DISPAS, M.; HALLIN, M.; DENIS, O.; SUETENS, C.; GORDTS, B.; STRUELENS, M.; BUTAYE, P. Prevalence and Antimicrobial Susceptibility of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Among Pigs in Belgium. **Microbial Drug Resistance**, v.18, n. 2, p. 125-131, 2012.
- CUI, L. MURAKAMI, H.; KUWAHARA-ARAI, K.; HANAKI, H.; HIRAMATSU, K. Contribution of a thickened cell wall and its glutamine nonamidated component to the vancomycin resistance expressed by *Staphylococcus aureus* Mu50. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 44, p.2276-2285, 2000.
- DE BOER, E.; ZWARTKRUIS-NAHUIS, J. T. M.; WIT, B.; HUIJSDENS, X.W.; NEELING, A.J.; BOSCH, T. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in meat. **International Journal Food Microbiology**, v.134, n. 1, p.52-58, 2009.
- DE BUYSER, M.-L.; DUFOUR, B.; MAIRE, M.; LAFARGE, V. Implication of milk and milk products in food-borne diseases in France and in different industrialised countries. **International Journal of Food Microbiology**, v. 67, p. 1-17, 2001.
- DE NEELING, A.J.; VAN DEN BROEK, M.J.M; SPALBURG, E.C.; VAN SANTEN-VERHEUVEL, M.G.; DAM-DEISZ, W.D.C; BOSHUIZEN, H.C.; VAN DE GIESSEN, A.W.; VAN DUIJKEREN, E.; HUIJSDENS, X.M. High prevalence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in pigs. **Veterinary Microbiology**, v.122, p. 366-372, 2007.
- DIAS, N.L., SILVA, D.C.B., OLIVEIRA, D.C.B.S, FONSECA JUNJIOR, A.A., SALES, M.L., SILVA, N. Detecção dos genes de *Staphylococcus aureus*, enterotoxinas e de resistência à metilicina em leite. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.**, v. 63, n.6, p.1547-1552,2011.
- D’SILVA J., Factory farming and developing countries: a compassion in world farming trust briefing. **Compassion in World Farming Trust**, Petersfield, Hampshire, Inglaterra, 2000. 17p.
- HACKBARTH, C.J. & CHAMBERS, H.F. *blaI* and *blaRi* Regulate  $\beta$ -Lactamase and PBP 2a Production in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.37, n.5, p.1144-1149, 1993.
- HANSON, B.M.; DRESSLER, A.E.; HARPER, A.L.; SCHEIBEL, R.P.; WARDYN, S.E.; ROBERTS, L.K.; KROEGER, J.S.; SMITH, T.C. Prevalence of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) on retail meat in Iowa. **Journal of Infection and Public Health**, v.4, n.4, p. 169-74, 2011.

- ISO, ISO 6888-2 - Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs - Horizontal Method for the Enumeration of Coagulase Positive Staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species): Part 1. Technique using Rabbit Plasma Fibrinogen agar medium. **International Organization of Standardization**, Geneva. 1999.
- KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN, J.R. **Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology**. 5ed. Philadelphia: Lippincott/Williams & Wilkins, 1997. 1395p.
- LEE, J. H. Methicilin (Oxacilin) – resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from major foof animals and their potencial transmission to humans. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, n11, p. 6489 – 6494, 2003.
- LIMA, E.S.C.; PINTO, P.S.A.; SANTOS, J. L.; VANETTI, M.C.D.; BEVILACQUA, P.D.; ALMEIDA, L.P.; PINTO, M.S.; DIAS, F.C. Isolamento de *Salmonella sp.* e *Staphylococcus aureus* no processo do abate suíno com subsídio ao sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle – APPCC. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 24, n. 4 p. 185- 190, 2004.
- LOWY, F.D. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. **The Journal of Clinical Investigation**, v.111, p.1265–1273, 2003.
- MASSON, G. C. I. H.; FERREIRA, G.S.; CARVALHO, L.F.O.S. Perfil de Resistência a antimicrobianos de *Staphylococcus aureus* Isolados de Granjas e Frigoríficos de Suínos. **Archives of Veterinary Science**, v. 17, n.1, p. 1-14, 2012.
- MEHROTRA, M.; WANG, G.; JOHSON, W.M. Multiplex PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1, and methicillin resistance. **Journal of Clinical Microbiology**, v.38, n. 3, p. 1032-1035, 2000.
- MILANI, L.; FRIES, L. PAZ, P., BELLÉ, M.; TERRA, N. Bioproteção de lingüiça de frango. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 23, p. 161-166, 2003.
- MIMICA, M.J., BEREZIN, E.N. *Staphylococcus aureus* resistente à vancomicina: um problema emergente. **Arquivos Médicos dos Hospitais e da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo**, v.51, n.2, p.52-58,2006.
- MIRANI, Z.A.& JAMIL, N. Genomic organization of a vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of the College of Physicians and Surgeons Pakistan**, v.23, n. 2, v-107-118,2013.
- PALERMO-NETO, J. Considerações gerais sobre o uso de agentes que alteram a produção animal. In: SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. 685p.
- PÉREZ-ROTH, E.; CLAVERIE-MARTÍN, F.; VILLAR, J.; MÉNDEZ-ÁLVAREZ, S. Multiplex PCR for Simultaneous Identification of *Staphylococcus aureus* and Detection of Methicillin and Mupirocin Resistance. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 11, p. 4037-4041, 2001.
- HURLIMANN-DALEL, R.L.; RYFFEL, C.; KAYSER, F. H.; BERGER-BACHI, B. Survey of the Methicillin Resistance-Associated Genes *mecA*, *mecRI-mecI*, and *femA-femB* in Clinical

- Isolates of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 36, n. 12, p. 2617-2621, 1992.
- SCHRAFT, H.; KLEINLEIN, N.; UNTERMANN, F.; Contamination of pig hindquarters with *Staphylococcus aureus*. **Internacional Journal of Food Microbiology**, v.15, n. 1/2, p.191-194, 1992.
- SMITH, T.C.; MALE, M.J.; HARPER, A.L.; KROEGER, J.S.; TINKLER, G.P.; MORITZ, E.D.; CAPUANO, A.W.; HERWALDT, L.A.; DIEKEMA, D.J. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Strain ST398 is presente in midwestern U.S. swine and swine-workers. **Plos One**, v.4, n.1, p. 1-6, 2009.
- LEE, J. H. Methicilin (Oxacilin) – resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from major food animals and their potencial transmission to humans. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, n11, p. 6489 – 6494, 2003.
- LIMA, E.S.C.; PINTO, P.S.A.; SANTOS, J. L.; VANETTI, M.C.D.; BEVILACQUA, P.D.; ALMEIDA, L.P.; PINTO, M.S.; DIAS, F.C. Isolamento de *Salmonella* sp. e *Staphylococcus aureus* no processo do abate suíno com subsídio ao sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle – APPCC. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 24, n. 4 p. 185- 190, 2004.
- STEGGER, M.; ANDERSEN, P.S.; KEARNS, A.; PICHON, B.; HOLMES, M.A.; EDWARDS, G.; LAURENT, F.; TEALE, C.; SKOV, R. ; LARSEN,A.R. Rapid Detection, differentiation and typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* harbouring either *mecA* or the new *mecA* homologue *mecALGA251*. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, p. 395-400, 2011.
- STROMMINGER, B.; KETTLITZ, C.; WERNER, G.; WITTE, W. Multiplex PCR assay for simultaneous detection of nine clinically relevant antibiotic resistance genes in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Microbiology**; v.41, n. 9, p. 4089-4094,2003.
- TANIH, N.F.; SEKWADI, E.; NDIP, R.N.; BESSONG, P.O. Detection of pathogenic *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* from cattle and pigs slaughtered in abattoirs in Vhembe District, South Africa. **The Scientific World Journal**, v. 2015, p.1-8, 2015.
- TENHAGEM, B. A.; FETSCH, A.; STÜHRENBERG, B.; SCHLEUTER, G.; GUERRA, B.; HAMMERL, J.A.; HERTWIG, S.; KOWALL, J.; KÄMPE, U.; SCHROETER, A.; BRÄUNIG, J; KÄSBOHRER, A.; APPEL, B. Prevalence of MRSA types in slaughter pigs in different German abattoirs. **Veterinary Record**, v. 165, n. 20, p. 589 – 593, 2009.
- TIWARI, H.K. & SEN, M.R. Emergence of vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* (VRSA) from a tertiary care hospital from northern part of India. **BMC Infectious Diseases**, v.6, n.156, p.1-6, 2006.
- ULLAH,F.;MALIK,S.A.;AHMED,J.;ULLAH,F;SHAH,S.M.;AYAZ,M.;HUSSAIN,S.;KHATON,L..Investigation of the Genetic Basis of Tetracycline Resistance in *Staphylococcus aureus* from Pakistan. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v.11, n.06, p.925-931, 2012.
- VESTERHOLM-NIELSEN, M.; LARSEN, M. O.; OLSEN, J. E.; AARESTRUP, FRANK MOLLER. Occurrence of the blaZ gene in penicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolated

from bovine mastitis in Denmark. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 40, n. 3, p. 279-286, 1999.

WHO, World Health Organization. **Antimicrobial Resistance**. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/en/>>. Acesso em: 13 de mai. 2017.

WOODFORD,N.;MORRISON,D.;JOHNSON,A.P.;BRIANT,V.;GEORGE,R.C.;COOKSON,B. Application of DNA Probes for rRNA and van,A Genes to Investigation of a Nosocomial Cluster of Vancomycin-Resistant Enterococci. **Journal of Clinical Microbiology**, v.31, n. 3, p. 653-658, 1993.

## CONCLUSÕES

*Staphylococcus aureus* é um importante problema de saúde pública e de inocuidade alimentar e o fato dos seres humanos e animais serem portadores desta bactéria, contribuem para que ela permaneça ao longo de toda a cadeia produtiva de carne suína, como observado neste estudo. A alta temperatura da escaldagem e do chamuscamento e a lavagem das carcaças podem reduzir significativamente a contagem de *Staphylococcus aureus*. No entanto, recontaminações podem ocorrer durante a manipulação e processamento, permitindo que bactérias resistentes a antibióticos cheguem ao alimento.

Para se ter um alimento microbiologicamente seguro, é necessário haver uma conscientização sobre o uso de antibióticos durante a produção dos suínos. Aliado a isso, um efetivo controle de qualidade dentro da indústria frigorífica é essencial para que falhas na produção dos suínos e no abate e processamento sejam eliminadas.

Outro fator preocupante é a ocorrência de múltipla resistência a diferentes classes de antibióticos desde a granja até o produto final. Em todas as etapas da cadeia produtiva de carne suína houveram cepas de *S. aureus* resistentes a antibióticos. Como observado neste estudo, as cepas que permanecem ao longo da cadeia são os isolados mais resistentes, capazes de driblar higienizações e processos térmicos e são grandes fontes de genes de resistência.

Em virtude do grande poder de adaptação de *S. aureus*, a identificação genotípica da resistência demanda a pesquisa de um grande número de genes de resistência e não permite a comparação com o perfil de resistência fenotípico. Todo esse rastreamento da cadeia produtiva teve como objetivo fornecer informações para melhorar o processo produtivo de modo a minimizar a disseminação de bactérias resistentes a antibióticos na população humana e animal.

## ANEXO

Foram selecionadas 10 isolados identificados como *Staphylococcus aureus* para avaliação da coincidência de resultados fenotípicos entre a metodologia de concentração mínima inibitória (MIC) e o teste de susceptibilidade a concentração do breakpoint, conforme protocolos descritos pelo CLSI (2016) e por BAE et al. (2005). Foram avaliados 11 diferentes antibióticos e como controle negativo foi utilizado a cepa *S. aureus* ATCC 29213, conforme recomendações do CLSI (2016).

O teste de susceptibilidade pelo MIC foi realizado em triplicata e para cada antibiótico testado foram testadas 6 diferentes concentrações, sendo 3 concentrações superiores ao MIC, a MIC e 2 concentrações abaixo da MIC, conforme CLSI (2016). O breakpoint foi feito em duplicata e a concentração utilizada foi a MIC determinada pelo CLSI. Culturas overnight dos isolados selecionados foram diluídos para uma turbidez semelhante ao tubo 1 da escala de McFarland, e semeadas nos poços de placas de titulação previamente preparados com os antibióticos a serem testados nas concentrações descritas previamente. Em todas as placas utilizadas foram reservados poços para controles de contaminação (sem inoculação de nenhuma cultura), e controles de crescimento das culturas (sem adição de antimicrobianos). As placas foram incubadas a 37 °C, e após 24 h foram realizadas leituras de densidade optica das culturas. As médias das densidades ópticas, após ajustes necessários (branco), foram comparadas por ANOVA e teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) para verificação de diferenças significativas entre os crescimentos das culturas nas diferentes concentrações de antibióticos e os controles (ausência de antimicrobianos) (Tabela suplementar 1). A coincidência entre os resultados obtidos pelas metodologias foi avaliada pelo teste de McNemar ( $p < 0,05$ ). Todas as análises estatísticas foram realizadas com auxílio do software XLStat.

A grande vantagem do breakpoint frente ao MIC é a possibilidade de avaliar até 96 isolados simultaneamente, o que reduz os custos com a pesquisa e minimiza o tempo gasto no procedimento de verificação da resistência. As 2 metodologias se mostraram equivalentes para determinação fenotípica de resistência à oxacilina, gentamicina e clindamicina, mas para todos os outros podem ser considerados coincidentes, uma vez que nenhum apresentou o valor de  $p < 0,05$ . Para penicilina e ciprofloxacina as coincidências foram menores (Tabela suplementar 2).

Esses dados aprovam o teste de susceptibilidade a concentração do breakpoint como método alternativo ao MIC para avaliação da resistência de *S. aureus* frente aos 11 antibióticos testados, o que favorece o uso racional dos recursos laboratoriais. No entanto, é desejável uma pesquisa com um maior universo amostral e com outros antibióticos para validar este método. Adicionalmente, essa metodologia pode ser considerada válida para realização de uma triagem e comparação de grandes populações de micro-organismos; entretanto, testes adicionais confirmatórios devem ser realizados, como o teste de susceptibilidade pelo MIC e pesquisa de genes relacionados a resistência.

Tabela suplementar 1. Resultados fenotípicos obtidos pela metodologia de Concentração Mínima Inibitoria (MIC: Minimal Inhibitory Concentration) e pelo teste de susceptibilidade a concentração de breakpoint (Breakpoint) para identificação de resistência a diferentes antibióticos por *Staphylococcus aureus* obtidos de cadeia produtiva de carne suína.

Classe	Antibimicrobiano	Concentração	Isolados										
			3	33	94.1	95.1	124.1	134.1	166.1	167.1	177.1	191.1	ATCC 29213
Penicilinas	Oxacilina	0 µg/mL (Controle)	1,040 ab	1,217 ab	0,375 a	0,671 a	0,394 a	0,253 a	1,333 a	0,063 a	1,379 a	0,615 a	0,378 a
		1 µg/mL	1,011 abc	1,183 b	0,010 b	0,184 c	0,003 b	0,000 b	1,295 a	0,057 ab	1,353 a	0,017 b	0,211 b
		2 µg/mL	0,982 bc	1,155 b	0,271 a	0,424 b	0,002 b	0,000 b	1,269 a	0,057 b	1,305 ab	0,016 b	0,173 c
		4 µg/mL	0,961 c	1,152 b	0,011 b	0,188 c	0,003 b	-0,001 b	1,314 a	0,057 b	1,315 ab	0,021 b	0,117 d
		8 µg/mL	0,958 c	1,185 b	0,012 b	0,005 c	0,002 b	-0,001 b	1,277 a	0,055 b	1,327 ab	0,044 b	0,048 e
		16 µg/mL	0,995 bc	1,208 ab	0,011 b	0,010 c	0,002 b	-0,003 b	1,279 a	0,057 b	1,315 ab	0,029 b	0,024 e
		32 µg/mL	1,074 a	1,272 a	0,006 b	-0,001 c	0,002 b	-0,002 b	1,271 a	0,051 b	1,256 b	0,022 b	0,025 e
		<i>p</i>	0,026	0,022	0,017	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	0,827	0,047	0,101	< 0,0001	< 0,0001
	MIC	R (4)	R (?)	S (1)	S (1)	S (1)	S (1)	R (>32)	S (2)	R (32)	S (1)	S (1)	
	breakpoint	R	R	S	S	S	S	R	S	R	R	S	
	Penicilina	0 µg/mL (Controle)	0,522 a	0,892 b	0,630 a	0,356 b	1,342 ab	0,483 a	1,189 a	0,198 a	1,274 a	0,568 d	0,474 a
		0,075 µg/mL	0,491 a	0,904 ab	0,547 a	0,487 ab	1,328 ab	0,461 a	1,169 a	0,152 a	1,127 b	0,667 c	0,462 a
		0,125 µg/mL	0,383 ab	0,909 ab	0,537 a	0,483 ab	1,253 b	0,452 a	1,198 a	0,223 a	1,121 b	0,643 c	0,359 a
		0,25 µg/mL	0,401 ab	0,902 ab	0,560 a	0,549 a	1,264 b	0,435 a	1,212 a	0,007 a	1,219 ab	0,672 c	0,340 a
		0,5 µg/mL	0,386 ab	0,902 ab	0,577 a	0,522 a	1,263 b	0,457 a	1,200 a	0,008 a	1,240 ab	0,680 bc	0,367 a
1 µg/mL		0,250 b	0,910 ab	0,763 a	0,504 ab	1,306 ab	0,440 a	1,201 a	0,007 a	1,264 a	0,725 b	0,368 a	
2 µg/mL		0,595 a	0,992 a	0,663 a	0,465 ab	1,381 a	0,457 a	1,200 a	0,007 a	1,285 a	0,833 a	0,429 a	
<i>p</i>		0,112	0,363	0,629	0,266	0,096	0,662	0,925	0,248	0,073	< 0,0001	0,328	
MIC	R (?)	R (?)	R (?)	R (?)	R (?)	R (>2)	R (>2)	R (>2)	R (>2)	R (>2)	R (?)	R (>2)	
breakpoint	R	R	S	S	S	S	R	S	R	R	R		

Continuação.

Classe	Antibimicrobiano	Concentração	Isolados											
			3	33	94.1	95.1	124.1	134.1	166.1	167.1	177.1	191.1	ATCC 29213	
Glicopeptídeos	Vancomicina	0 µg/mL (Controle)	0,455 ab	0,892 a	0,579 a	0,368 a	1,326 b	0,466 a	1,186 a	0,343 a	1,173 a	0,641 a	0,333 a	
		4 µg/mL	0,516 ab	0,896 a	0,009 b	0,013 b	1,424 a	0,402 a	1,159 a	0,407 a	1,171 a	0,013 b	0,032 b	
		8 µg/mL	0,346 b	0,920 a	0,005 b	0,029 b	1,301 b	0,438 a	1,086 a	0,015 b	1,110 a	0,020 b	0,024 b	
		16 µg/mL	0,559 ab	0,890 a	0,006 b	0,031 b	1,309 b	0,368 a	0,836 b	0,011 b	0,970 b	0,016 b	0,024 b	
		32 µg/mL	0,497 ab	0,901 a	0,002 b	0,011 b	1,236 c	0,400 a	0,703 bc	0,012 b	0,807 c	0,014 b	0,027 b	
		64 µg/mL	0,677 a	0,931 a	0,006 b	0,010 b	0,971 d	0,095 b	0,680 c	0,012 b	0,572 d	0,013 b	0,022 b	
		128 µg/mL	0,618 ab	0,982 a	0,002 b	0,011 b	0,909 e	0,030 b	0,453 d	0,013 b	0,251 e	0,018 b	0,034 b	
		<i>p</i>	0,278	0,478	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	0,000	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
		MIC	R (?)	R (> 128)	S (4)	S (4)	R (32)	R (64)	R (16)	S (8)	R (16)	S (4)	S (4)	
		breakpoint	R	R	S	S	S	S	R	S	R	S	S	
Aminoglicosídeos	Gentamicina	0 µg/mL (Controle)	1,197 a	1,202 a	0,909 a	0,423 a	0,476 a	1,161 a	1,282 a	1,101 a	1,315 a	0,477 a	0,552 a	
		4 µg/mL	0,248 b	0,224 b	0,216 b	-0,005 b	0,459 a	0,063 b	0,525 b	0,024 b	0,597 b	0,217 b	0,074 b	
		8 µg/mL	0,052 c	0,086 c	0,184 b	0,008 b	0,239 b	0,048 bc	0,452 b	0,028 b	0,407 c	0,111 c	0,087 b	
		16 µg/mL	0,026 c	0,060 c	0,174 b	0,021 b	0,081 c	0,041 c	0,080 c	0,021 b	0,044 d	0,038 d	0,066 b	
		32 µg/mL	0,026 c	0,058 c	0,181 b	0,009 b	0,048 c	0,030 c	0,037 c	0,039 b	0,014 d	0,015 d	0,083 b	
		64 µg/mL	0,027 c	0,053 c	0,198 b	0,022 b	0,045 c	0,035 c	0,038 c	0,024 b	0,011 d	0,028 d	0,070 b	
		128 µg/mL	0,030 c	0,065 c	0,186 b	-0,004 b	0,052 c	0,044 bc	0,040 c	0,038 b	0,014 d	0,035 d	0,071 b	
		<i>p</i>	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
		MIC	S (4)	S (4)	S (4)	S (4)	S (8)	S (4)	S (4)	S (4)	S (4)	S (4)	S (4)	S (4)
		Breakpoint	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

Continuação.

Classe	Antibimicrobiano	Concentração	Isolados											
			3	33	94.1	95.1	124.1	134.1	166.1	167.1	177.1	191.1	ATCC 29213	
Macrolídeos	Eritromicina	0 µg/mL (Controle)	1,245 a	1,202 a	1,282 a	1,176 a	0,939 a	1,291 a	1,445 a	1,223 a	1,383 a	1,421 a	1,208 a	
		2 µg/mL	1,183 b	1,137 b	1,229 ab	1,040 b	0,911 a	1,318 a	1,291 ab	0,937 c	1,433 a	1,341 b	1,164 b	
		4 µg/mL	1,135 b	1,081 c	1,252 a	1,043 b	0,914 a	1,273 ab	1,178 bc	1,045 b	1,316 b	1,319 b	1,138 bc	
		8 µg/mL	1,162 b	1,058 cd	1,149 b	1,001 bc	0,908 a	1,209 b	1,064 cd	0,925 c	1,225 c	1,201 c	1,110 cd	
		16 µg/mL	1,138 b	1,089 c	0,992 c	0,945 cd	0,938 a	1,022 c	1,135 c	0,761 d	1,129 d	1,033 d	1,072 d	
		32 µg/mL	1,150 b	1,034 d	0,975 c	0,911 de	0,910 a	0,854 d	1,102 c	0,676 e	1,026 e	0,961 e	1,016 e	
		64 µg/mL	1,136 b	1,039 d	1,040 c	0,842 e	0,880 a	0,889 d	0,914 d	0,672 e	0,953 f	0,946 e	0,959 f	
		<i>p</i>	0,017	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	0,841	< 0,0001	0,000	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
		MIC	S (2)	S (2)	R (8)	S (2)	R (> 64)	R (8)	S (4)	S (2)	S (4)	S (2)	S (2)	
		Breakpoint	R	R	S	S	S	S	R	S	R	R	S	
Tetraciclínas	Tetraciclina	0 µg/mL (Controle)	0,404 a	0,876 a	0,737 a	0,536 a	1,361 a	0,442 a	1,307 a	0,563 a	1,283 a	0,726 a	0,445 a	
		4 µg/mL	0,581 a	0,860 a	0,006 b	0,014 b	0,948 b	0,349 b	0,684 b	0,038 b	0,843 c	0,029 b	0,091 c	
		8 µg/mL	0,478 a	0,844 a	0,007 b	0,020 b	0,936 b	0,397 ab	0,685 b	0,017 b	0,966 b	0,041 b	0,082 c	
		16 µg/mL	0,482 a	0,790 ab	0,008 b	0,016 b	0,937 b	0,427 a	0,639 b	0,002 b	0,939 bc	0,022 b	0,079 c	
		32 µg/mL	0,069 b	0,692 b	0,007 b	0,010 b	0,934 b	0,358 b	0,611 b	-0,001 b	0,866 c	0,025 b	0,079 c	
		64 µg/mL	0,111 b	0,528 c	0,006 b	0,012 b	0,872 b	0,117 c	0,481 c	0,007 b	0,549 d	0,023 b	0,080 c	
		128 µg/mL	0,077 b	0,339 d	0,041 b	0,011 b	0,783 b	0,052 d	0,447 c	0,011 b	0,454 d	0,030 b	0,120 b	
		<i>p</i>	0,002	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	0,001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
		MIC	R (32)	R (32)	S (4)	S (4)	S (4)	S (4)	S (4)	S (4)	S (4)	S (4)	S (4)	
		breakpoint	R	R	S	S	S	S	R	S	S	R	S	

Continuação.

Classe	Antibimicrobiano	Concentração	Isolados											
			3	33	94.1	95.1	124.1	134.1	166.1	167.1	177.1	191.1	ATCC 29213	
Fluoroquinilonas	Ciprofloxacina	0 µg/mL (Controle)	0,462 a	0,909 ab	0,544 a	0,514 a	1,395 a	0,444 a	1,256 a	0,618 a	1,292 a	0,645 c	0,579 ab	
		1 µg/mL	0,502 a	0,916 ab	0,637 a	0,518 a	1,364 a	0,449 a	1,272 a	0,638 a	1,197 a	0,689 bc	0,587 a	
		2 µg/mL	0,392 a	0,902 ab	0,798 a	0,483 a	1,387 a	0,430 a	1,262 a	0,527 a	1,283 a	0,670 bc	0,608 a	
		4 µg/mL	0,384 a	0,899 ab	0,639 a	0,334 b	1,350 a	0,482 a	1,287 a	0,525 a	1,307 a	0,654 bc	0,593 a	
		8 µg/mL	0,378 a	0,888 b	0,139 b	0,426 ab	1,380 a	0,438 a	1,235 a	0,567 a	1,265 a	0,662 bc	0,634 a	
		16 µg/mL	0,399 a	0,926 ab	0,011 b	0,074 c	1,130 b	0,442 a	1,325 a	0,655 a	1,226 a	0,730 b	0,483 ab	
		32 µg/mL	0,282 a	0,974 a	0,007 b	0,014 c	0,977 c	0,449 a	1,168 a	0,506 a	1,266 a	0,847 a	0,387 b	
		<i>p</i>	0,532	0,328	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	0,769	0,543	0,970	0,662	0,001	0,152	
		MIC	R (> 32)	R (> 32)	R (8)	R (4)	R (16)	R (> 32)	R (> 32)	R (> 32)	R (> 32)	R (> 32)	R (16)	R (32)
		breakpoint	R	R	S	S	S	S	R	S	R	R	R	
Lincosamidas	Clindamicina	0 µg/mL (Controle)	1,198 a	1,180 ab	1,149 b	1,144 a	1,126 a	1,293 a	1,245 a	1,323 ab	1,261 a	1,346 a	1,025 a	
		1 µg/mL	1,143 ab	1,212 a	1,272 a	0,952 bc	1,096 a	1,120 b	0,958 b	1,333 a	1,173 b	1,342 a	0,981 ab	
		2 µg/mL	1,100 ab	1,184 ab	1,247 a	1,012 b	1,000 b	1,084 b	0,917 bc	1,267 b	1,080 c	1,286 a	0,904 bc	
		4 µg/mL	1,094 b	1,152 bc	0,976 c	0,823 c	0,873 c	0,991 c	0,856 cd	1,121 c	0,921 d	1,178 b	0,809 cd	
		8 µg/mL	1,108 ab	1,100 c	0,877 d	0,648 d	0,703 d	0,902 d	0,838 cd	1,085 c	0,836 e	0,991 c	0,728 d	
		16 µg/mL	1,107 ab	1,011 d	0,757 e	0,532 de	0,641 d	0,644 e	0,828 d	0,848 d	0,724 f	0,788 d	0,616 e	
		32 µg/mL	1,091 b	0,945 e	0,484 f	0,457 e	0,480 e	0,417 f	0,849 cd	0,698 e	0,485 g	0,645 e	0,546 e	
		<i>p</i>	0,331	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	
		MIC	R (4)	R (4)	R (4)	S (1)	S (2)	S (1)	S (1)	S (2)	S (1)	R (4)	S (2)	
		Breakpoint	R	R	S	S	S	S	R	S	R	R	S	

Continuação.

Classe	Antibimicrobiano	Concentração	Isolados											
			3	33	94.1	95.1	124.1	134.1	166.1	167.1	177.1	191.1	ATCC 29213	
Sulfonamidas	Sulfametoxazole	0 µg/mL (Controle)	1,295 a	1,235 a	1,288 a	1,234 a	0,929 ab	1,351 a	1,284 a	1,250 a	1,311 a	1,474 a	1,223 a	
		9,5 µg/mL	1,191 c	1,129 b	0,861 b	1,024 b	0,849 bc	1,101 b	1,228 ab	0,640 c	1,111 b	0,946 b	0,810 bc	
		19 µg/mL	1,151 c	1,053 bc	0,843 b	0,942 bc	0,862 bc	1,005 c	1,160 bc	0,642 c	1,031 cd	0,844 c	0,783 bc	
		38 µg/mL	1,184 c	1,032 c	0,806 b	0,889 cd	0,846 c	0,947 d	1,091 cd	0,648 c	0,985 d	0,806 c	0,766 c	
		76 µg/mL	1,194 c	1,038 c	0,790 b	0,852 d	0,858 bc	0,937 d	1,055 d	0,683 c	0,989 d	0,789 c	0,767 c	
		152 µg/mL	1,216 bc	0,997 c	0,797 b	0,844 d	0,875 bc	0,896 d	1,036 d	0,703 bc	0,983 d	0,802 c	0,805 bc	
		304 µg/mL	1,270 ab	1,042 bc	0,845 b	0,820 d	0,957 a	0,897 d	1,030 d	0,790 b	1,059 bc	0,852 c	0,836 b	
		<i>p</i>	<i>0,010</i>	<i>0,001</i>	<i>&lt; 0,0001</i>	<i>&lt; 0,0001</i>	<i>0,061</i>	<i>&lt; 0,0001</i>	<i>0,000</i>	<i>&lt; 0,0001</i>	<i>&lt; 0,0001</i>	<i>&lt; 0,0001</i>	<i>&lt; 0,0001</i>	<i>&lt; 0,0001</i>
		MIC	S (9.5)	S (9.5)	S (9.5)	S (9.5)	R (?)	S (9.5)	S (19)	S (9.5)	S (9.5)	S (9.5)	S (9.5)	S (9.5)
		Breakpoint	R	R	S	S	S	S	R	S	R	R	R	S
Fenicóis	Cloranfenicol	0 µg/mL (Controle)	1,163 a	1,121 a	0,965 a	0,572 a	0,432 a	1,228 a	1,280 a	1,128 a	1,295 a	0,523 a	0,693 a	
		8 µg/mL	1,134 a	1,099 ab	0,719 b	0,123 b	0,167 b	1,188 ab	0,821 b	0,968 b	1,123 b	0,287 b	0,271 b	
		16 µg/mL	1,137 a	1,090 ab	0,255 c	0,020 c	0,106 c	1,128 bc	0,680 c	0,818 c	1,057 bc	0,175 c	0,179 c	
		32 µg/mL	1,149 a	1,081 ab	0,157 cd	0,011 c	0,013 d	1,079 cd	0,193 d	0,481 d	1,036 c	0,085 d	0,096 d	
		64 µg/mL	1,087 a	1,061 b	0,123 d	0,046 c	0,015 d	0,989 d	0,068 e	0,077 e	0,602 d	0,063 d	0,036 ef	
		128 µg/mL	1,110 a	0,952 c	0,103 d	-0,004 c	0,012 d	0,418 e	0,043 e	0,101 e	0,066 e	0,041 d	0,084 de	
		256 µg/mL	0,998 b	0,355 d	0,144 cd	0,012 c	0,069 c	0,041 f	0,043 e	0,056 e	0,028 e	0,036 d	0,026 f	
		<i>p</i>	<i>0,007</i>	<i>&lt; 0,0001</i>	<i>&lt; 0,0001</i>	<i>&lt; 0,0001</i>	<i>&lt; 0,0001</i>	<i>&lt; 0,0001</i>	<i>&lt; 0,0001</i>	<i>&lt; 0,0001</i>	<i>&lt; 0,0001</i>	<i>&lt; 0,0001</i>	<i>&lt; 0,0001</i>	<i>&lt; 0,0001</i>
		MIC	R (256)	R (64)	S (8)	S (8)	S (8)	S (16)	S (8)	S (8)	S (8)	S (8)	S (8)	S (8)
		Breakpoint	R	R	S	S	S	S	R	S	R	R	R	S

Continuação.

Classe	Antibimicrobiano	Concentração	Isolados										
			3	33	94.1	95.1	124.1	134.1	166.1	167.1	177.1	191.1	ATCC 29213
Ansamicinas	Rifampicina	0 µg/mL (Controle)	1,204 a	1,220 a	1,122 ab	1,109 a	1,128 a	1,332 a	1,225 a	1,315 a	1,293 a	1,358 a	1,004 a
		1 µg/mL	1,158 a	1,215 a	1,196 a	1,005 ab	1,152 a	0,904 b	0,930 b	1,280 a	0,955 b	1,170 b	0,987 a
		2 µg/mL	1,062 a	1,155 a	0,941 b	0,954 b	1,080 a	0,885 b	0,907 b	0,844 b	0,932 b	0,961 c	0,839 b
		4 µg/mL	0,754 ab	0,885 b	0,902 b	0,756 c	0,759 b	0,587 c	0,711 c	0,609 c	0,766 c	0,754 d	0,711 c
		8 µg/mL	0,272 c	0,525 c	0,393 c	0,373 d	0,430 c	0,422 d	0,436 d	0,304 d	0,374 d	0,407 e	0,333 d
		16 µg/mL	0,238 c	0,196 d	0,298 c	0,256 de	0,204 d	0,237 e	0,179 e	0,101 e	0,205 e	0,232 f	0,115 e
		32 µg/mL	0,453 bc	0,214 d	0,268 c	0,173 e	0,099 d	0,134 e	0,124 e	0,070 e	0,161 e	0,135 g	0,128 e
		<i>p</i>	0,001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
	MIC	R (8)	R (4)	S (2)	S (2)	R (4)	S (1)	S (1)	S (2)	S (1)	S (1)	S (2)	
	breakpoint	R	R	S	S	S	S	R	S	R	R	S	

Tabela suplementar 2. Coincidência de resultados fenotípicos obtidos pela metodologia de Concentração Mínima Inibitória (MIC: Minimal Inhibitory Concentration) e pelo teste de susceptibilidade a concentração de breakpoint (Breakpoint) para identificação de resistência a diferentes antibióticos por *Staphylococcus aureus* obtidos de cadeia produtiva de carne suína.

Classe	Antimicrobiano	MIC		Breakpoint		Coincidence	Teste de McNemar	Chances de erro ao rejeitar MIC = breakpoint
		R	S	R	S			
Penicilinas	Oxacilina (metecilina)	4	6	5	5	9/10	Q = 0.00, p = 1.000	100%
	Penicilina	10	0	5	5	5/10	Q = 3.20, p = 0.074	7.36%
Glicopeptídeos	Vancomicina	6	4	4	6	8/10	Q = 0.50, p = 0.480	47.95%
Aminoglicosídeos	Gentamicina	0	10	0	10	10/10	Q = 0.00, p = 1.000	100%
Macrolídeos	Eritromicina	3	7	5	5	2/10	Q = 0.13, p = 0.724	72.37%
Tetraciclina	Tetraciclina	2	8	4	6	8/10	Q = 0.50, p = 0.480	47.95%
Quinolonas	Ciprofloxacina	10	0	5	5	5/10	Q = 3.20, p = 0.074	7.36%
Lincosamidas	Clindamicina	4	6	5	5	7/10	Q = 0.00, p = 1.000	100%
Sulfonamidas	Sulfametoxazole	1	9	5	5	4/10	Q = 1.50, p = 0.221	22.07%
Fenicóis	Cloranfenicol	2	8	5	5	7/10	Q = 1.33, p = 0.248	24.82%
Ansamicinas	Rifampicina	3	7	5	5	6/10	Q = 0.25, p = 0.617	72.37%

Obs.: valores de  $p < 0.05$  indicam diferenças significativas entre os métodos de detecção de resistência ao antimicrobiano testado. R: Resistente, S: Sensível