

ANDREZA ANGÉLICA FERREIRA

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE
Staphylococcus spp. ISOLADOS DE DIFERENTES
NICHOS EM UMA UNIDADE DE ABATE DE AVES**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2011

ANDREZA ANGÉLICA FERREIRA

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE
Staphylococcus spp. ISOLADOS DE DIFERENTES
NICHOS EM UMA UNIDADE DE ABATE DE AVES**

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

APROVADA: 7 de fevereiro de 2011

Prof. Maurilio Lopes Martins

Prof^ª. Edimar Aparecida F. Fontes

Prof. Luiz Simeão do Carmo

Pesquisadora Cláudia Lúcia de Oliveira Pinto

Prof^ª. Regina Célia Santos Mendonça
(Orientadora)

À minha família pelo incondicional apoio,
amor, carinho e compreensão.
E por me fazerem acreditar que quando se tem Deus no coração
somos capazes de vencer todas as dificuldades.

DEDICO

*“Aprender é a única coisa que a mente
nunca tem medo, nunca se cansa
e nunca se arrepende.”*

(Leonardo Da Vinci)

AGRADECIMENTOS

À Deus por estar sempre do meu lado, iluminando-me nos momentos mais difíceis; pela fé, saúde, força de vontade, oportunidade, discernimento, tranquilidade, enfim por todas as coisas boas que contribuí em minha vida.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade da realização deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio financeiro.

À professora Regina Célia Santos Mendonça pela orientação, oportunidade, confiança, amizade, paciência, apoio e pelos ensinamentos proporcionados.

À professora Maria Cristina Dantas Vanetti pela orientação, amizade, apoio e ensinamentos.

Ao professor Sérgio Oliveira de Paula pela orientação, apoio e ensinamentos.

Ao professor Maurilio Lopes Martins e a professora Edimar Aparecida Filomeno Fontes que desde a graduação contribuíram para minha formação profissional, pela amizade, carinho, apoio, ensinamentos e participação na banca examinadora.

Ao professor Luiz Simeão do Carmo e à Dra. Cláudia Lúcia de Oliveira Pinto pela disponibilidade e participação na banca examinadora.

Ao Laboratório de Microbiologia e Ecologia Microbiana da Universidade Federal de Minas Gerais por intermédio do professor Luiz Simeão do Carmo pela doação de micro-organismos utilizados neste trabalho.

Aos meus pais, Moacir e Ana, fonte de respeito e admiração, pelo grande amor, carinho, orgulho, compreensão e apoio em todos os momentos da minha vida.

Aos meus irmãos, Alysso e Adriano, pelo amor, amizade, companheirismo e apoio sempre. Valeu Alysso pelos conselhos e por me fazer acreditar em mim mesma até quando eu achava que não seria possível. E Adriano pelos momentos felizes e de descontração, muito obrigada!

Aos meus lindos sobrinhos, João Pedro e Mateus, a tia ama muito vocês!

As minhas cunhadas, Cláudia e Raquel, pela amizade e apoio.

Ao Álvaro pelo amor, carinho, amizade, incentivo, conselhos, paciência e por compreender a minha ausência em diversos momentos. Obrigada pelos momentos de felicidade em que podíamos ficar juntos.

As grandes amigas que fiz, Márcia, Patrícia e Ariana pela imensa ajuda, apoio, amizade e pelos bons momentos compartilhados, sem vocês tudo teria sido mais difícil, muito obrigada!

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia de Patógenos de Origem Alimentar e Hídrica (LAMPOAH), Natália, Humberto, Luiz Augusto, Delaine, Janaina, Arthur, Érica, Élide, Nádia e Flávia, pela amizade, apoio, pelos momentos de descontração e por dividirem as preocupações.

As meninas da república, Valdilene, Marina e Michelle pelo companheirismo, amizade e momentos de descontração.

Aos grandes amigos que fiz em Viçosa durante esses anos, pela amizade, incentivo, por compartilharem comigo os bons e maus momentos, valeu por tudo galera!

Aos amigos de longa data, aqui representados por Elianise, Marília, Janaina, Natiely e Laíse pela amizade, incentivo e carinho.

Aos funcionários do Departamento de Tecnologia de Alimentos pela disponibilidade prestada.

Aos professores de graduação, Maurilio, Eliane, Vanessa, Maurício, Aurélia, Milene, Edimar, Bruno e Roselir pela amizade, conselhos, auxílio nas tomadas de decisões e por me incentivarem para que hoje eu possa agradecer-los pela finalização de mais uma etapa importante em minha vida.

Enfim a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho ficam aqui os meus sinceros agradecimentos.

BIOGRAFIA

Andreza Angélica Ferreira, filha de Moacir do Nascimento Ferreira e Ana Maria do Nascimento Ferreira, nasceu em São João Del Rei, Minas Gerais, no dia 18 de Fevereiro de 1988.

Em Fevereiro de 2009 graduou-se em Tecnologia em Laticínios pelo Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas, Campus Rio Pomba, Rio Pomba, Minas Gerais.

Em Março de 2009, ingressou no curso de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais.

SUMÁRIO

RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
OBJETIVOS.....	3
Objetivo geral.....	3
Objetivos específicos	3
CAPÍTULO I.....	5
REVISÃO DE LITERATURA.....	5
1. Características de <i>Staphylococcus</i> spp.	5
2. Fatores de virulência de <i>Staphylococcus</i> spp	7
3. Resistência microbiana em <i>Staphylococcus</i>	10
4. Aspectos relacionados à formação de biofilme por <i>Staphylococcus</i>	12
5. Referências	16
CAPÍTULO II.....	22
CARACTERIZAÇÃO DE ESTIRPES DE <i>Staphylococcus</i> ISOLADAS EM UMA UNIDADE DE ABATE DE AVES.....	22
RESUMO	22
1. Introdução.....	23
2. Material e métodos	24
2.1. Coleta de amostras e metodologia de análise	24
2.2. Isolamento das estirpes	24
2.3. Extração do DNA genômico para ensaios fundamentados em PCR	25
2.4. Identificação de gênero e espécie de <i>Staphylococcus</i> por PCR.....	26
2.5. Sensibilidade dos isolados a antimicrobianos	27
3. Resultados e discussão	28
3.1. Identificação bioquímica e molecular	28

3.2. Perfil de sensibilidade/resistência de <i>Staphylococcus</i> spp. à antimicrobianos.....	32
4. Conclusão.....	36
5. Referências.....	37
CAPÍTULO III.....	41
POTENCIAL DE ADESÃO E DE FORMAÇÃO DE BIOFILME POR <i>Staphylococcus</i> spp. ISOLADOS DE ABATEDOURO DE AVES	41
RESUMO	41
1. Introdução.....	42
2. Material e métodos	43
2.1. Espécies bacterianas	43
2.2. Avaliação fenotípica da produção de exopolissacarídeo	44
2.3. Extração do DNA genômico.....	44
2.4. Reação de PCR para a identificação dos genes <i>icaAD</i> e <i>atl</i>	45
3. Resultados e discussão	46
3.1. Detecção fenotípica da produção de exopolissacarídeo.....	46
3.2. Presença dos genes <i>atl</i> , <i>icaA</i> e <i>icaD</i>	49
4. Conclusão.....	52
CONCLUSÕES GERAIS	53
5. Referências.....	54

RESUMO

FERREIRA, Andreza Angélica. M.Sc. Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2011. **Caracterização fenotípica e genotípica de *Staphylococcus* spp. isolados de diferentes nichos em uma unidade de abate de aves.** Orientador: Regina Célia Santos Mendonça. Co-orientadores: Maria Cristina Dantas Vanetti e Sérgio Oliveira de Paula.

O controle de patógenos de origem alimentar no processamento de alimentos não é uma tarefa simples. *Staphylococcus aureus* é um patógeno que pode estar presente na superfície de carcaças de animais e tem acesso à planta de abate da indústria por meio de animais vivos. Esse micro-organismo pode desencadear processos de adesão e formação de biofilme, que constitui uma estratégia de sobrevivência e importante fonte de contaminação cruzada. O objetivo deste trabalho foi isolar e caracterizar fenotípica e geneticamente estirpes do gênero *Staphylococcus* spp. oriundas de uma unidade de abate de aves e determinar as principais fontes e os mecanismos envolvidos na permanência deste micro-organismo na indústria. As colônias isoladas conforme descrito na Instrução Normativa n° 62, foram confirmadas como *Staphylococcus* spp. e *S. aureus* por meio da técnica de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR). Avaliou-se a sensibilidade dos isolados aos antimicrobianos pelo método de discos impregnados com as seguintes substâncias: ácido clavulânico e amoxicilina (30 µg), ácido nalidíxico (30 µg), ampicilina (10 µg), cefalotina (30 µg), cefoxitina (30 µg), ciprofloxacina (5 µg), clindamicina (2 µg), cloranfenicol (30 µg), eritromicina (15 µg), estreptomicina (10 µg), gentamicina (10 µg), oxacilina (1 µg), penicilina G (10 U), rifampicina (5 µg), sulfonamida (300 µg), tetraciclina (30 µg) e vancomicina (30 µg). As características fenotípicas e genotípicas de formação de biofilmes foram

avaliadas pelo crescimento em Ágar Vermelho Congo (CRA) e pela identificação dos genes *atl*, *icaA* e *icaD*. Dentre os 120 isolados estudados, 75 foram identificados como *Staphylococcus*, em que 63,7 % foram coagulase positiva e 37,3 % coagulase negativa. Por meio da técnica de PCR confirmou-se que 86,67 % dos isolados eram do gênero *Staphylococcus* e 77,33 % da espécie *S. aureus*. Verificou-se ainda a presença do gene *sec* em duas estirpes, uma delas estafilococos coagulase negativa. A maioria dos isolados foram resistentes à sulfonamida (98,5 %), ácido nalidíxico (89,3 %) e penicilina G (87,70 %). Dentre os isolados resistentes à penicilina 4,60 % foram oxacilina resistentes e 1,5 % vancomicina resistentes. Das 65 estirpes de *Staphylococcus* spp. estudadas na produção de exopolissacarídeo (EPS) em CRA, 100 % formaram colônias de cor preta e opacas. A variação do teor de sacarose foi crítica para a produção de EPS em CRA, uma vez que em baixas concentrações de sacarose, todas as estirpes apresentaram resultado característico de não produção de EPS. O gene *atl* foi encontrado em todas as estirpes e os genes *icaA* e *icaD* em 97 % delas. Estes dados sugerem que *Staphylococcus* spp. isolados de abatedouro de aves apresentam potencial para formação de biofilme. Formas eficientes de controle desse micro-organismo no ambiente de processamento de alimentos são necessárias visto que podem representar risco em potencial ao consumidor. Portanto, devem-se adotar medidas de controle higiênico-sanitário, bem como treinamento e conscientização dos profissionais envolvidos.

ABSTRACT

FERREIRA, Andreza Angélica. M.Sc. Universidade Federal de Viçosa, February of 2011. **Phenotypic and genotypic characterization of *Staphylococcus* spp. isolated from different niches in a poultry processing unit.** Adviser: Regina Célia Santos Mendonça. Co-advisers: Maria Cristina Dantas Vanetti e Sérgio Oliveira de Paula.

The control of foodborne pathogens in food processing is not a simple task. The *Staphylococcus aureus* is a pathogen that can be present on the surface of animal carcasses and enter the slaughter plant of the industry by means of live animals. This microorganism can initiate adhesion processes and biofilm formation, which is a survival strategy and an important source of cross contamination. The aim of this study was to isolate and characterize the phenotypic and genetically strains of *Staphylococcus* spp. from a poultry processing plant and determine the main sources and the mechanisms involved in the permanence of this microorganism in the industry. The isolated colonies as described in Instruction No. 62, were confirmed as *Staphylococcus* spp. and *S. aureus* using the technique of Polymerase Chain Reaction (PCR). The sensibility of isolates to antimicrobial agents was evaluated by the detection method using paper disks impregnated with the following substances: amoxicillin and clavulanic acid (30 mg), nalidixic acid (30 mg), ampicillin (10 mg), cephalothin (30 mg), cefoxitin (30 g), ciprofloxacin (5 mg), clindamycin (2 mg), chloramphenicol (30 mg), erythromycin (15 mg), streptomycin (10 mg), gentamicin (10 mg), oxacillin (1 mg), penicillin G (10 U), rifampicin (5 g), sulfonamide (300 mg), tetracycline (30 mg) and vancomycin (30 mg). The phenotypic and genotypic characteristics of biofilm formation were evaluated by the growth in Congo Red Agar (CRA) and by the identification of the *atl*, *icaA* and *icaD* genes. Among the 120 studied isolates 75 were identified as

Staphylococcus, in which 63.7 % were coagulase positive and coagulase negative 37.3 %. Through the technique of PCR it was confirmed that 86.67 % of the isolates were *Staphylococcus* and 77.33 % of the *S. aureus* species. It was also noticed the presence of the *sec* gene in two strains, a staphylococci coagulase negative. Most isolates were resistant to sulfonamide (98.5%), nalidixic acid (89.3%) and penicillin G (87.70%). Among the penicillin-resistant isolates were oxacilin resistant 4.60 % and 1.5 % vancomycin resistant. Of the 65 strains of *Staphylococcus* spp. studied in the production of exopolysaccharide (EPS) in CRA, 100 % formed colonies and opaque black. The variation of sucrose content was critical for the production of exopolysaccharide (EPS) in CRA, since at low concentrations of sucrose, all strains showed a characteristic result was no production of EPS. The *atl* gene was found in all strains and the *icaA* and *icaD* genes were found in 97 % of them. The data suggest that *Staphylococcus* spp. isolated from poultry slaughter show potential for biofilm formation. An efficient control of this micro-organism in the food processing environment is necessary as they may represent a potential risk to consumers. Therefore, measures to control the sanitary-hygiene must be adopted, as well as the awareness and training of the professionals that are involved.

INTRODUÇÃO GERAL

O controle de patógenos de origem alimentar no processamento de alimentos não é uma tarefa simples. Muitos patógenos sobrevivem no ambiente por horas ou mesmo dias e podem ser veiculados ao homem de várias maneiras. Entre os patógenos associados às doenças de origem alimentar, destaca-se a espécie *Staphylococcus aureus*, capaz de produzir uma variedade de fatores de patogenicidade e de virulência, sendo que as intoxicações causadas por este patógeno estão frequentemente associadas às enterotoxinas termoestáveis. Em geral, os manipuladores de alimentos são considerados as principais fontes de contaminação de *S. aureus*, além de equipamentos e superfícies.

Estirpes do gênero *Staphylococcus* spp. ao contaminarem uma superfície inapropriadamente higienizada podem desencadear processos de adesão e formação de biofilme que dificultam a ação de agentes sanificantes físicos e químicos, uma vez que as células do biofilme são embebidas em uma matriz de exopolissacarídeo (EPS), o que confere proteção a agentes externos. Além disso, os micro-organismos em biofilme exibem diferenciados fenótipos, metabolismo, fisiologia e transcrição gênica.

Uma vez constituídos, os biofilmes constituem focos de contaminação constante, por liberarem células de micro-organismos. Outro agravante é a presença de estirpes resistentes aos mais variados tipos de antimicrobianos usados para o tratamento de infecções causadas por *S. aureus*, o que representa um problema de saúde pública.

Assim, determinar o perfil antimicrobiano e conhecer as condições que propiciam a formação de biofilme por estafilococos é primordial para a obtenção de informações relevantes que permitam o estabelecimento de

estratégias de controle, mais econômicas e eficazes para a eliminação deste patógeno na cadeia alimentar.

O conhecimento do perfil genotípico de *S. aureus* apresenta grande importância no que se refere ao conhecimento dos mecanismos que envolvem seu desenvolvimento e estabelecimento no ambiente industrial. Nesse aspecto, o uso de métodos fundamentados em Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) para diagnóstico microbiano é uma alternativa viável aos métodos tradicionais de cultura.

Em função da necessidade da produção de alimentos seguros, este trabalho teve como objetivos identificar e caracterizar estirpes do gênero *Staphylococcus* oriundas de uma unidade de abate de aves quanto à sensibilidade microbiana, aspectos toxigênicos, e potencial de adesão e formação de biofilme.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Isolar e caracterizar fenotípica e genotipicamente estirpes do gênero *Staphylococcus* spp. oriundas de uma unidade de abate de aves.

Objetivos específicos

- a) Isolar e identificar fenotipicamente estirpes do gênero *Staphylococcus* oriundas de uma unidade de abate de aves;
- b) Identificar genotipicamente estirpes do gênero *Staphylococcus* e da espécie *Staphylococcus aureus*;
- c) Pesquisar a presença dos genes associados à produção de toxinas clássicas em *Staphylococcus aureus*;
- d) Avaliar o perfil de sensibilidade/resistência microbiana em estirpes do gênero *Staphylococcus* e de estirpes de *Staphylococcus aureus*;
- e) Pesquisar a presença dos genes responsáveis pelos processos de adesão e formação de biofilme em estirpes do gênero *Staphylococcus* e em estirpes de *Staphylococcus aureus*;

- f) Identificar fenotipicamente a produção de exopolissacarídeo em estirpes do gênero *Staphylococcus* e em estirpes de *Staphylococcus aureus*;

- g) Avaliar o potencial de adesão e formação de biofilme em estirpes do gênero *Staphylococcus* e na espécie *Staphylococcus aureus*, bem como relacionar a presença dos genes com a produção fenotípica de exopolissacarídeo.

CAPÍTULO I

REVISÃO DE LITERATURA

1. Características de *Staphylococcus* spp.

Estafilococos são caracterizados como micro-organismos Gram-positivos, imóveis, de formato esférico, com diâmetro variando de 0,5 a 1,0 μm , agrupados em massas irregulares em forma de “cacho”. Apresentam metabolismo respiratório e fermentativo, atuando sobre carboidratos com produção de ácidos, sendo anaeróbios facultativos. Podem crescer entre 7 °C a 48 °C, com um ótimo entre 30 °C a 37 °C (CUNHA NETO et al., 2002). Algumas espécies produzem enterotoxinas em temperaturas que variam entre 10 °C e 46 °C, contudo, a temperatura ótima está entre 40 °C e 45 °C (JAY, 2005).

O gênero *Staphylococcus* compreende diversas espécies e subespécies, que se encontram amplamente distribuídas na natureza, sendo principalmente isoladas da pele e membranas mucosas de aves e mamíferos (JAY, 2005). Esse gênero foi classificado na família *Micrococcaceae* desde a sua proposição em 1884 por Rosenbach. Entretanto, considerando os avanços na última década das técnicas de biologia molecular, estudos genéticos, perfis de ácidos graxos, composição da parede celular e, principalmente, estudos com RNA ribossômico 16S, estabeleceu-se que o gênero *Staphylococcus* foi incluído na família *Staphylococcaceae* (MELO, 2008).

Franco e Landgraf (2008) ressaltaram que estes micro-organismos apresentam tolerância a nitratos e a concentrações de 10 a 20 % de NaCl, e que tem capacidade de crescer em meios com valores de atividade de água

(Aa) de 0,86, mas sob condições ideais, podem se desenvolver em valores de Aa próximos a 0,83 sem que ocorra a produção de enterotoxinas.

Atualmente, são descritas 40 espécies no gênero (EUZÉBY, 2007), sendo *Staphylococcus aureus* a espécie enterotoxigênica mais comumente causadora de doenças de origem alimentar. Entretanto usualmente é identificado apenas o grupo estafilococos coagulase positiva, uma vez que a maioria das estirpes enterotoxigênicas de *S. aureus* produzem a enzima coagulase (DESMARCHELIER et al., 1999).

No entanto, estirpes coagulase negativa também podem estar associadas à produção de toxinas. Lamaita et al. (2005) isolaram 436 estirpes de *Staphylococcus* sp. de amostras de leite cru refrigerado, e agruparam as estirpes de mesmo perfil bioquímico em grupos, constatando que 24,6 % dos grupos de estafilococos coagulase positiva apresentaram algum tipo de toxina, enquanto que 41,3 % dos grupos de estafilococos coagulase negativa também foram enterotoxigênicos.

Franco e Landgraf (2008) relataram que não existe uma concordância sobre a dose infectante de toxina capaz de causar sintomas em seres humanos, porém, de maneira geral, estima-se que esteja entre 0,015 µg e 0,375 µg de enterotoxina por quilo de peso corpóreo. Lamaita et al. (2005) descreveram que é necessário menos que 1µg de toxina pura para desencadear os sintomas característicos de intoxicação estafilocócica, sendo que a população de 10⁵ UFC de estafilococos/g ou mL de alimento é considerada suficiente para provocar um quadro de intoxicação, enquanto que Jay (2005) relatou que 200 ng seriam suficientes para causar a enfermidade.

Vários tipos de alimentos são implicados em intoxicações gastrointestinais por *S. aureus*, sendo frequentemente relacionado com carne e derivados, devido às propriedades de atividade de água, pH e nutrientes, e a extensiva manipulação destes alimentos durante o processamento (ANANOU et al., 2005). Em estudos foi demonstrado que aproximadamente 50 % da população humana é portadora assintomática de *S. aureus* (GUNDOGAN et al., 2005; MOLINA, 2009).

Amson et al. (2006) em um levantamento de dados epidemiológicos sobre doenças de origem alimentar, reportaram que *S. aureus* foi considerado o principal causador das doenças no estado do Paraná no período de 1978 a

2000, com relato de 492 surtos de intoxicação estafilocócica, o que representa 41,2 % do total dos surtos relacionados a alimentos no estado neste período.

A contaminação por *Staphylococcus* spp. pode ocorrer durante os estágios de produção ou estocagem do alimento, por estirpes de origem ambiental ou humana (CUNHA NETO et al., 2002).

Os estafilococos são facilmente eliminados por tratamentos térmicos, como a pasteurização, mas suas enterotoxinas termoestáveis permanecem ativas nos alimentos, o que representa um risco potencial para a saúde do consumidor e um problema para a saúde pública. Essas enterotoxinas são responsáveis por quadros de intoxicação alimentar estafilocócica no homem, caracterizados por náusea, vômito, diarreia, dor de cabeça, cólica abdominal, câibra muscular, queda de pressão sanguínea e prostração. Em casos graves, o indivíduo pode necessitar de cuidados médicos; crianças e idosos podem chegar ao óbito (RAPINI et al., 2005).

O controle da disseminação deste patógeno e da produção das enterotoxinas é possível desde que sejam observadas as boas práticas sanitárias de higiene nos estágios de obtenção, produção, estocagem e manuseio dos alimentos.

2. Fatores de virulência de *Staphylococcus* spp.

Estafilococos produzem e secretam 30 ou mais fatores de virulência específicos que interferem nos sistemas de defesas do hospedeiro (DINGES et al., 2000). Vários desses fatores de virulência envolvidos na patogênese de *S. aureus* são descritos na literatura (NOVICK et al., 2001; LAMAITA et al., 2005; KÉROUANTON et al., 2007; KUMAR et al., 2009; PELISSER et al., 2009), e envolvem um grupo de enzimas e citotoxinas, os quais incluem quatro hemolisinas (alfa, beta, gama e delta), nucleases, proteases, lipases, hialuronidase e colagenase, que agem associadas e ocasionam lesão tecidual, e fornecem nutrientes de baixo peso molecular que podem ser assimilados e utilizados para o rápido crescimento desta bactéria (DINGES et al., 2000), além de outras enzimas como catalase, fibrinolizina, coagulase e β -lactamase. A produção destas enzimas e citotoxinas são reguladas por elementos genéticos como plasmídios, transposons e profagos, considerados importantes fatores de

virulência nas infecções estafilocócicas no homem e nos animais (NOVICK et al., 2001).

A coagulase livre e ligada, por vezes chamada de fator de agregação, pode agir para revestir as células bacterianas com a conversão direta de fibrinogênio em fibrina e, assim, protege as células da fagocitose (SANDEL e McKILLIP, 2004). A coagulase não atua isolada, mas em associação com outras toxinas estafilocócicas e fatores celulares, o que resulta em um fenômeno complexo de patogenicidade (GANDRA, 2003).

Entre as enzimas associadas aos fatores de virulência em *Staphylococcus* spp., destacam-se também a catalase e a termonuclease. A catalase inativa o peróxido de hidrogênio e radicais livres tóxicos formados pelo sistema mieloperoxidase no interior das células fagocitárias e é utilizada para diferenciar *Staphylococcus* de *Streptococcus*. A termonuclease (TNase) é uma fosfodiesterase estável ao calor com propriedades endo e exonucleolítica (SANDEL e McKILLIP, 2004) e atua na clivagem de DNA ou RNA para produzir 3`- fosfomononucleotídeos (GANDRA, 2003).

A hialuronidase degrada a matriz intercelular de mucopolissacarídeos nos tecidos do hospedeiro e facilita a disseminação de estafilococos em outros tecidos. As lipases por meio da atividade específica de fosfatidilinositol fosfolipase C, propagam-se pelos tecidos cutâneo e subcutâneo. As hemolisinas tem impacto em uma série de funções biológicas, o qual as α -hemolisinas tem um efeito catalizador sobre as células vermelhas do sangue. A β -hemolisina é uma esfingomielinase, que atua no complexo esfingomielin lipocarboidrato. E a hemolisina δ é produzida por algumas linhagens de *S. aureus*, que causa lise em diferentes tipos celulares (SANDEL e McKILLIP, 2004).

Algumas proteínas, como citotoxinas, exoenzimas, adesinas e proteína A são responsáveis pela capacidade que o micro-organismo possui em se defender das defesas do hospedeiro, aderir às células e moléculas da matriz intercelular, invadir ou destruir as células do hospedeiro e a se propagar dentro dos tecidos. A produção destas proteínas é mediada por uma cadeia complexa de funções regulatórias cuja expressão *in vitro* é temporariamente programada e depende amplamente, direta ou indiretamente, de sinais ambientais (VOJTOV et al., 2002).

Apesar dos mecanismos de patogenicidade de *S. aureus* ainda não serem completamente elucidados, provavelmente os fatores de virulência mais notáveis associados a este micro-organismo sejam as enterotoxinas termoestáveis, que causam intoxicação alimentar e a toxina do choque tóxico 1 (TSST-1) (SANDEL e McKILLIP, 2004;. KÉROUANTON et al., 2007) considerada como um superantígeno, por estimular uma resposta policlonal inespecífica de linfócitos T e aumentar a liberação de citocinas, o que causa toxicidade sistêmica e supressão da resposta imune adaptativa (BALABAN e RASOOLY, 2000). A toxina do choque tóxico 1 é susceptível à clivagem pela pepsina, e é menos estável nos intestinos comparado as enterotoxinas estafilocócicas (DINGES et al., 2000). A doença causada pela TSST-1 é aguda e caracteriza-se por febre alta, hipotensão e envolve três ou mais órgãos sistêmicos, dentre outros (LAMAITA et al., 2005).

As enterotoxinas estafilocócicas são proteínas extracelulares, hidrossolúveis, resistentes à ação de enzimas proteolíticas do sistema digestivo e termoestáveis. São resistentes às temperaturas de pasteurização, e podem estar presentes no alimento mesmo após o cozimento, o que possibilita a instalação de um quadro de intoxicação de origem alimentar e representa um risco para a saúde pública. Até o momento, já foram identificados 20 tipos de enterotoxinas, que são sorologicamente distintas, incluindo os tipos clássicos SEA, SEB, SEC (1, 2, 3), SED e SEE e as novas enterotoxinas SEG, SEH, SEI, SEJ, SEK, SEL, SEM, SEN, SEO, SEP, SEQ, SER, e SEU (CUNHA NETO et al., 2002; FRANCO e LADGRAF, 2008), cujos genes correspondentes foram descritos por Becker et al., 1998; Omoe et al., 2005.

Os genes que codificam as toxinas estafilocócicas são transportados por plasmídeos, bacteriófagos, ou elementos heterólogos genéticos, denominados de ilhas de patogenicidade. A expressão é controlada por pelo menos três sistemas globais de regulação dos fatores de virulência, denominados: gene regulador (*agr*) (MOMTAZ et al., 2010), gene regulador estafilocócico (*sarA*) (BEENKEN et al., 2003), e um sistema de repressão catabólica. Cada toxina é traduzida em uma proteína precursora contendo um sinal de uma sequência aminoterminal que é clivada durante a exposição da célula (DINGES et al., 2000).

A transferência horizontal de genes entre linhagens de *Staphylococcus* e outras bactérias implica na difusão de genes de virulência, incluindo os genes

de regulação, o que resulta em uma diversidade de estirpes. Como exemplo, dentre os superantígenos inclui uma lista crescente de exotoxinas pirogênicas estreptocócicas, as quais todos compartilham sequência e propriedades biológicas similares às de superantígenos de *S. aureus*. Acredita-se que a capacidade de produzir superantígenos oferece uma vantagem seletiva, pois permite que as bactérias desabilitem o sistema imunológico do hospedeiro (NOVICK et al., 2001).

O acúmulo de fatores de resistência são associados à imunidade de *Staphylococcus* a uma grande variedade de antibióticos comumente utilizados, o que aumenta a capacidade das bactérias em sobreviver em ambientes hostis. A ocorrência generalizada destes isolados pode levar a surtos de infecções e intoxicações estafilocócicas no ambiente hospitalar e na comunidade (KUMAR et al., 2009).

3. Resistência microbiana em *Staphylococcus*

A resistência aos antimicrobianos está associada à existência de genes presentes no micro-organismo que codificam proteínas relacionadas a diferentes mecanismos bioquímicos que impedem a ação dos antibióticos. Esta resistência pode ser originada de mutações que ocorrem na bactéria durante seu processo reprodutivo e resultam em erros de cópia na sequência de bases que formam o DNA cromossômico. Outra origem da resistência é a conhecida resistência transferível que se faz por meio dos mecanismos de transdução, transformação e conjugação e, frequentemente, envolve genes situados em plasmídios e transposons (TAVARES, 2000), ou ainda, pode estar associada às condições ambientais e mecanismos de resposta ao estresse provocado por perturbação do envelope celular, danos no DNA, ou falhas no metabolismo intermediário, tendo assim um impacto sobre o desenvolvimento e expressão da resistência (McCALLUM, 2010).

A partir da década de 40 com a introdução da penicilina houve maior controle das infecções estafilocócicas, porém após alguns anos de uso clínico a resistência ocorreu associada à seleção de estirpes produtoras de β -lactamases que hidrolisam as penicilinas (MOTAMEDI et al., 2010; KESERU et al., 2011).

Para combater as linhagens resistentes foram desenvolvidas novas drogas β -lactâmicas como a meticilina e oxacilina e seus derivados (GRANDO et al., 2008). Porém, em 1961, na Europa, foi isolada a primeira estirpe resistente a esses novos β -lactâmicos, sendo denominadas de MRSA ou ORSA, ou seja, *Staphylococcus aureus* meticilina ou oxacilina resistentes (TAVARES, 2000). Atualmente existem muitas estirpes de *S. aureus* meticilina resistentes em ambientes relacionados aos serviços da saúde e na comunidade (GRANDO et al, 2008).

Em estudo populacional realizado na Inglaterra entre os anos de 2004 e 2005 foi identificado que todos os pacientes submetidos à hemocultura que continham *S. aureus* meticilina resistente estavam no registro nacional de óbitos. E também foi diagnosticado que 20 % e 38 % dos pacientes MRSA-positivos foram a óbito num período de sete e trinta dias, respectivamente (LAMAGNI et al., 2011).

Costa (2010) detectou a presença do gene *mecA* em 22,1 % dos 95 isolados de estafilococos provenientes de queijo minas frescal, e dentre estes, 9,5 % apresentaram-se como resistentes à meticilina pelo teste em disco de difusão.

A resistência à meticilina em estafilococos é associada à produção de uma proteína adicional e anômala de ligação à penicilina, denominada PBP2a, que apresenta baixa afinidade com os antibióticos β -lactâmicos. As PBPs são enzimas que catalisam a etapa terminal da síntese da parede bacteriana e são localizadas na membrana celular da bactéria, sendo que, normalmente, *S. aureus* possui cinco PBPs, sendo que as PBP 1, 2 e 3 são essenciais e tem alta afinidade (sítios-alvo) com os antibióticos β -lactâmicos e unem-se a estes por ligações covalentes (SOUZA et al, 2005). Esta proteína é codificada por um gene cromossômico denominado *mecA*, que é responsável pela resistência intrínseca dos estafilococos meticilina a todos os antibióticos β -lactâmicos, o que determina a multiplicação de estirpes resistentes mesmo na presença dessa classe de antibióticos (PINHO et al., 1998; SOUZA et al., 2005; KESERU et al., 2011).

Entretanto em alguns estudos foram observados discrepâncias entre linhagens que demonstram menor susceptibilidade à oxacilina/meticilina por apresentarem mecanismo de resistência não relacionada à presença do gene *mecA*, mas pela hiperprodução de β -lactamases (COLLI et al., 2009;

MOTAMEDI et al., 2010). Esta resistência dos estafilococos aos antibióticos β -lactâmicos depende de alguns fatores ambientais como pH, temperatura e osmolaridade (SOUZA et al., 2005).

Diante da disseminação de estirpes MRSA ou ORSA, a vancomicina é um antibiótico que vem sendo intensamente utilizado no tratamento de infecções causadas por essas linhagens (DURAI et al., 2010). Entretanto, já tem sido relatado em muitos países um aumento de estirpes resistentes a este antibiótico (BIERBAUM et al., 1999; ROTUN et al., 1999; GUERIN et al., 2000; KIM et al., 2000; TALLENT et al., 2002), conhecidas como *S. aureus* resistente-intermediário à vancomicina (VISA) ou *S. aureus* vancomicina resistente (VRSA). Esta resistência está associada a uma grande produção de componentes usados na síntese da parede celular. Em virtude da alta produção de resíduos de mucopeptídeo há uma redução da quantidade de antibiótico que chega ao seu local de ação que é a membrana citoplasmática (BOYLE-VAVRA et al., 2001), pois ocorre hiperprodução das proteínas ligadoras de penicilinas PBP2 e PBP2', espessamento da parede celular e aprisionamento das drogas (REIPERT et al., 2003).

Os genes envolvidos na resistência à vancomicina estão, provavelmente, sob o controle de um amplo sistema de regulação (CUI et al., 2000; KURODA et al., 2000).

A característica da resistência a determinado antimicrobiano pode estender-se a outros, por isso torna-se importante estudar a susceptibilidade de estirpes a diversos antibióticos. A técnica de difusão em disco é a mais utilizada por ser de fácil execução e obtenção de resultados relativamente rápidos. A leitura é realizada medindo-se os diâmetros dos halos de inibição formados ao redor dos discos e a interpretação é feita de acordo com a tabela de halos padronizada pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2007). Em geral, o resultado é expresso em sensível, moderadamente resistente (intermediário) e resistente.

4. Aspectos relacionados à formação de biofilme por *Staphylococcus*

Um biofilme é caracterizado por células que originam comunidades sésseis, aderidas irreversivelmente a um substrato, embebidas a uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares sintetizadas por si mesma. Apresenta

um fenótipo modificado com relação à taxa de crescimento, transcrição de genes e capacidade de resistir a tratamentos antimicrobianos e, portanto, representa um problema de saúde pública (DONLAN, 2001). Sob circunstâncias apropriadas biofilmes podem ser formados por todos os tipos de micro-organismos, inclusive deterioradores e patogênicos (POULSEN, 1999).

De acordo com Andrade (2008), a adesão e formação de biofilmes microbianos são indesejáveis, sob diversos aspectos na indústria de alimentos, uma vez que eles podem tornar menos eficientes o processo de tratamento da água; reduzir a eficiência de transferência de calor em trocadores de calor; diminuir o fluxo em tubulações; desencadear processos corrosivos; e, principalmente, tornar fontes de contaminação microbiana.

Uma vez introduzido no processamento de alimentos, *S. aureus* pode persistir em biofilmes por longos períodos de tempo e pode ser transferido de um ponto para outro e causar contaminações (SHALE et al., 2005).

Marques et al. (2007) verificaram a capacidade de *S. aureus* formar biofilme nas superfícies de aço inoxidável e vidro após 15 dias de incubação, com contagens bacterianas na ordem de 10^7 UFC·cm⁻² e 10^8 UFC·cm⁻², respectivamente.

A formação de biofilme por *S. aureus* também foi observada por Pompermayer e Gaylarde (2000) em superfície de polipropileno sob diferentes condições de temperatura, sendo que à temperatura de 12 °C houve melhor adesão.

Lima (2007) constatou a capacidade de adesão de estirpes de *S. aureus* isoladas de ambiente hospitalar em superfícies de silicone e poliuretano usadas para a construção de sondas nasoenterais, e observou por meio de fotomicrografias, que estas superfícies apresentaram-se com fendas, fissuras e orifícios, o que possivelmente facilitou a aderência do micro-organismo.

Boari et al. (2009) em um estudo sobre a formação de biofilme em aço inoxidável por *Aeromonas hydrophila* e *S. aureus* ao usar leite em diferentes condições de cultivo, constataram que em cultivo combinado com *A. hydrophila* foi observada a formação de biofilme por *S. aureus* apenas a 18 °C a partir do quarto dia, com contagem de células sésseis de $5,7 \cdot 10^5$ UFC·cm⁻², enquanto que em monocultivo a 18 °C o biofilme formava-se a partir do segundo dia, com contagem de $1,7 \cdot 10^8$ UFC·cm⁻² ao longo dos 10 dias pesquisados.

A aderência e fixação do micro-organismo nas superfícies de equipamentos e utensílios na indústria representam o primeiro passo para contaminação de alimentos (POMPERMAYER e GAYLARDE, 2000). Entre os mecanismos envolvidos na adesão bacteriana, a produção de uma substância extracelular polissacarídica natural, chamada de exopolissacarídeo (EPS), desempenha um importante papel. Esta substância permite que as células bacterianas se aglomerem em multicamadas de biofilme, tornando-as menos acessíveis ao sistema de defesa do organismo e aos antimicrobianos (ANTUNES et al., 2007).

A produção de EPS pelas bactérias do biofilme serve para muitas funções, que incluem: simplificação do acesso inicial das bactérias a uma superfície; formação e manutenção da micro-colônia; estrutura do biofilme; resistência do biofilme ao estresses ambientais e agentes antimicrobianos, bem como permite às bactérias a captação de nutrientes (POULSEN, 1999). O EPS é também capaz de adsorver cátions, metais e toxinas e conferir proteção contra radiações UV, alterações de pH, choques osmóticos e dessecação (BOARI et al., 2009).

A formação de biofilme em espécies do gênero *Staphylococcus* spp. é considerada um processo de duas etapas. Primariamente as bactérias aderem a uma superfície mediada por um antígeno capsular, a adesina capsular polissacarídica (PS/A). Em seguida multicamadas de células podem ser formadas em associação com a produção de adesina polissacarídica intercelular (PIA) (ARCIOLA et al., 2001; VASUDEVAN et al., 2003; YAZDANI et al., 2006). A PS/A e PIA são estruturalmente semelhantes com um arranjo em comum de β -1-6-glicosamina em alternância, mas diferem nas substituições primárias em seus grupos amino e peso molecular, além disso ambas são sintetizadas a partir de proteínas codificadas no *locus ica* do operon *ica*ABCD (ARCIOLA et al., 2001).

Os genes *icaA* e *icaD* foram relatados como significativos na formação de biofilme em *S. aureus* e *Staphylococcus epidermidis* (ARCIOLA et al., 2001; VASUDEVAN et al., 2003; YAZDANI et al., 2006; SATORRES e ALCARÁZ, 2007). Os genes e produtos do locus *ica* são considerados fundamentais para a formação de biofilme e virulência dos micro-organismos e são regulados em resposta a fatores ambientais, como glicose, anaerobiose, alta osmolaridade, temperatura, limitação de etanol e ferro (STANLEY e LAZAZZERA, 2004).

Proteínas de superfície bacteriana também foram identificadas como importantes na formação do biofilme estafilocócico (HALL-STOODLEY, 2004). As autolisinas *atlA*-autolisina de *S. aureus* (OSHIDA et al, 1995), e *atlE*-autolisina de *S. epidermidis* (HEILMANN et al, 1997), pertencem a um grupo de peptidoglicano hidrolases que desempenham um papel fundamental na degradação da parede celular bacteriana. Durante a divisão celular, estas autolisinas são responsáveis pela separação do septo entre duas células filhas (ZOLL et al., 2010).

A *atl* é predominante em estafilococos, sendo *atlA* e *atlE* muito semelhantes em sequência e propriedades. As enzimas são bifuncionais, compostas por uma amidase e uma glucosamidase. Mutantes de *S. aureus* e *S. epidermidis* com deleção de *atlA* e *atlE* são deficientes na fixação primária à superfície, o que resulta em não formação de biofilme (BISWAS et al., 2006).

Biofilmes são capazes de persistir na presença de agentes antimicrobianos em concentrações que são mil vezes superiores às necessárias para erradicar uma população de células planctônicas (CERCA et al., 2005). Isto se deve ao fato da matriz do biofilme exercer uma proteção física ou por uma alteração da fisiologia das células bacterianas no biofilme (FUX et al., 2005).

Acredita-se que para controlar ou erradicar os biofilmes é imprescindível conhecer os mecanismos envolvidos na sua formação. A utilização de eficientes e adequados sanificantes físicos ou químicos em equipamentos pode evitar a formação de biofilmes e/ou reduzir os índices de contaminação microbiana para a manutenção de um alimento com qualidade. Entretanto, como a eliminação de biofilmes em superfícies é difícil, a forma de remoção deve ser analisada como um todo a fim de otimizar os resultados e minimizar os custos (CASALINI, 2008).

Um método clássico para observar o potencial de produção de biofilme é o teste em placa de Ágar Vermelho Congo (CRA). A observação direta das colônias em meio sólido permite o reconhecimento fenotípico de amostras produtoras de biofilme, caracterizadas por colônias de cor preta e das não produtoras de biofilme, colônias vermelhas (FREEMAN et al., 1989). Comparações entre o teste em Ágar Vermelho Congo e a identificação dos genes responsáveis pelos processos de adesão e formação de biofilme por *Staphylococcus* spp. pela PCR, evidenciaram uma concordância entre esses

dois métodos, o que demonstra que a análise fenotípica das colônias pode ser um método confiável e utilizado na rotina do laboratório de controle de qualidade (ARCIOLA et al., 2001; VASUDEVAN et al., 2003; YAZDANI et al., 2006; GRINHOLC et al., 2007; SATORRES e ALCARÁZ, 2007).

5. Referências

- AMSON, G.V.; HARACEMIV, S.M.C.; MASSON, M.L. Levantamento de dados epidemiológicos relativos à ocorrências/ surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTAs) no estado do Paraná – Brasil, no período de 1978 a 2000. **Ciência Agrotecnica**, v. 30, n. 6, p. 1139-1145, 2006.
- ANANOU, S.; MAQUEDA, M.; MARTÍNEZ-BUENO, M.; GÁLVEZ, A.; VALDIVIA, E. Control of *Staphylococcus aureus* in sausages by enterocin AS-48. **Meat Science**, v.71, p.549–556, 2005.
- ANDRADE, N.J. **Higiene na indústria de alimentos: avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos**. São Paulo: Varela, 2008, 412p.
- ANTUNES, A.L.S.; PEREZ, L.R.R.; REITER, K.C.; SECCHI, C.; FREITAS, A.L. P. Detecção da produção de biofilme em *Staphylococcus* spp. por agar congo red. **Rev. de Saúde da UCPEL**, v.1, n.1, p.27-31, 2007.
- ARCIOLA, C.R.; BALDASSARRI, L.; MONTANARO, L. Presence of *icaA* and *icaD* Genes and Slime Production in a Collection of Staphylococcal Strains from Catheter-Associated Infections. **Journal of Clinical Microbiology**, p. 2151–2156, 2001.
- BALABAN, N.; RASOOLY, A. Staphylococcal Enterotoxins. **International Journal of Food Microbiology**, v.61, p. 1-10, 2000.
- BECKER, K.; ROTH, R.; PETERS, G. Rapid and specific detection of toxigenic *Staphylococcus aureus*: use of two multiplex PCR enzyme immunoassays for amplification and hybridization of staphylococcal enterotoxin genes, exfoliative toxin genes, and toxic syndrome toxin 1 gene. **Journal of Clinical Microbiology**, v.36, p.2548-2553, 1998.
- BEENKEN, K.E.; BLEVINS, J.S.; SMELTZER, M.S. Mutation of *sarA* in *Staphylococcus aureus* Limits Biofilm Formation. **Infection and Immunity**, p. 4206–4211, 2003.
- BIERBAUM, G.; FUCHS, K.; LENZ, W.; SZEKAT, C.; SAHL, H.-G. Presence of *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin in Germany. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 18, p.691–696, 1999.
- BISWAS, R.; VOGGU, L.; SIMON, U.K.; HENTSCHEL, P.; THUMM, G. Activity of the major staphylococcal autolysin Atl. **FEMS Microbiology Letters**, v. 259, p. 260-268, 2006.

- BOARI, C.A.; ALVES, M.P.; TEBALDI, V.M.R.; SAVIAN, T.V.; PICCOLI, R.H. Formação de biofilme em aço inoxidável por *Aeromonas hydrophila* e *Staphylococcus aureus* usando leite e diferentes condições de cultivo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.29, n.4, p.886-895, 2009.
- BOYLE-VAVRA, S.; LABISCHINSKI, H.; EBERT, C.C.; EHLERT, K.; DAUM, R. S. A spectrum of changes occurs in peptidoglycan composition of glycopeptide-intermediate clinical *Staphylococcus aureus* isolates. **Antimicrob Agents Chemother**, v.45, p.280-287, 2001.
- CASALINI, J. **Biofilmes microbianos na indústria de alimentos**. Trabalho acadêmico apresentado ao Curso de Bacharelado em Química de Alimentos da Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2008. 47p.
- CERCA, N.; MARTINS, S.; CERCA, F.; JEFFERSON, K.K.; PIER, G.B.; OLIVEIRA, R.; AZEREDO, J. Comparative assessment of antibiotic susceptibility of coagulase-negative staphylococci in biofilm versus planktonic culture as assessed by bacterial enumeration or rapid XTT colorimetry. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v.56, p.331–336, 2005.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Performance Standard for Antimicrobial Susceptibility Testing**, Tables M100 - S17, 2007.
- COLLI, V.C.; PIZZOLITTO, A.C.; RADDI, M.S.G. Determinação da resistência de *Staphylococcus aureus*: um desafio? **Revista Ciência Farmacêutica Básica Aplicada**, v.30, n.1, p.99-102, 2009.
- COSTA, J.C.B. **Avaliação do perfil de suscetibilidade a antimicrobianos e presença dos genes *mecA* e *qacA/B* em *Staphylococcus* spp. isolados de queijo Minas Frescal**. Dissertação de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, 2010. 90p.
- 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. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.44, p.2276–2285, 2000.
- CUNHA NETO, A.; SILVA, C.G.M.; STAMFORD, T.L.M. *Staphylococcus* enterotoxigênicos em alimentos *in natura* e processados no estado de pernambuco, Brasil. **Ciência e Tecnologia Alimentos**, v.22, n.3, p.263-27, 2002.
- DESMARCHELIER, P.M.; HIGGS, G.M.; MILLS, L.; SULLIVAN, A.M.; VANDERLINDE, P.B. Incidence of coagulase positive *Staphylococcus* on beef carcasses in three Australian abattoirs. **International Journal of Food Microbiology**, v.47, p.221–229, 1999.
- DINGES, M.M.; ORWIN, P.M.; SCHLIEVERT, P.M. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. **Clinical Microbiology Reviews**, v.13, p. 16-34, 2000.
- DONLAN, R.M. Biofilms and device-associated infections. **Emerging Infectious Diseases**, v. 7, n.2, p.277-281, 2001.
- DURAI, R.; NG, P. C.H.; HOQUE, H. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: An Update. **AORN Journal**, v.91, n.5, p.599-609, 2010.

- EUZÉBY, J.P. List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: a folder available on the internet. *International Journal Systematic Bacterial.*, v.47, p.590-592, 2007. (List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature. Disponível em: URL: <http://www.bacterio.cict.fr> Acessado em: 13/01/2011.
- FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. 3ª Ed. São Paulo: Atheneu, 2008.
- FREEMAN, D.J.; FALKINER, F.R.; KEANE, C.T. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. **Journal Clinical Pathology**, n.42, p.872-874, 1989.
- FUX, C.A.; COSTERTON, J.W.; STEWART, P.S.; STOODLEY, P. Survival strategies of infectious biofilms. **Trends in Microbiology**, v.13, p.34-40, 2005.
- GANDRA, E.A. **Identificação de *Staphylococcus aureus*, *S. intermedius* e *S. hyicus* através de testes bioquímicos e da amplificação por PCR de seqüências dos genes *coa* e *nuc***. Dissertação de mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial da Faculdade de Agronomia "Eliseu Maciel" da Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Rio Grande do Sul, 2003, 102p.
- GRANDO, W.F.; SCAPIN, D.; MALHEIROS, P.S.; ROSSI, E.M.; TONDO, E.C. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from handlers of dairy industry. **Alimentos e Nutrição**, v.19, n.4, p. 467-471, 2008.
- GRINHOLC, M.; WEGRZYN, G.; KURLEND, J. Evaluation of biofilm production and prevalence of the *icaD* gene in methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strains isolated from patients with nosocomial infections and carriers. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v.50, p.375–379, 2007.
- GUERIN, F.; BUU-HOÏ, A.; MAINARDI, J.-L.; KAC, G.; COLARDELLE, N.; VAUPRÉ, S. GUTMANN, L.; PODGLAJEN, I. Outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to glycopeptides in a Parisian hospital. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, p.2985–2988, 2000.
- GUNDOGAN, N.; CITAK, S.; YUCEL, N.; DEVREN, A. A note on the incidence and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from meat and chicken samples. **Meat Science**, v.69, p. 807–810, 2005.
- HALL-STOODLEY, L.; COSTERTON, J.W.; STOODLEY, P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2. p. 95-108, 2004.
- HEILMANN, C.; HUSSAIN, M.; PETERS, G.; GÖTZ, F.; Evidence for autolysin-mediated primary attachment of *Staphylococcus epidermidis* to a polystyrene surface. **Molecular Microbiology**, v. 24, p. 1013-1024, 1997.
- JAY, J.M. **Microbiologia de alimentos**. 6ª edição. Porto Alegre: Artmed, 2005. 771p.
- KÉROUANTON, A.; HENNEKINNE, J.A.; LETERTRE, C.; PETIT, L.; CHESNEAU, O.; BRISABOIS, A.; DE BUYSER, M.L. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains associated with food poisoning outbreaks in France. **International Journal of Food Microbiology**, v.115, p.369-375, 2007.

- KESERU, J.S.; SZABO, I.; GÁL, Z.; MASSIDDA, O.; MINGOIA, M.; KASZANYITZKY, E.; JÁNOSI, S.; HULVELY, J.; CSORBA, A.; BUZÁS, K.; HUNYADI-GULYÁS, E.; MEDZIHRADESKY, K. F.; BIRÓ, S. Identification of β -lactamases in human and bovine isolates of *Staphylococcus aureus* strains having borderline resistance to penicillinase-resistant penicillins (PRPs) with proteomic methods. **Veterinary Microbiology**, v.147, p. 96–102, 2011.
- KIM, M.-N.; PAI, C.H.; WOO, J.H.; RYU, J.S.; HIRAMATSU, K. Vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* in Korea. **Journal of Clinical Microbiology**, v.38, p.3879–3881, 2000.
- KUMAR, J. D.; NEGI, Y. K.; GAUR, A.; KHANNA, D. Detection of virulence genes in *Staphylococcus aureus* isolated from paper currency. **International Journal of Infectious Diseases**, v.13, p.450-455, 2009.
- KURODA, M.; KUWAHARA-ARAI, K.; HIRAMATSU, K. Identification of the up- and down-regulated genes in vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* strains Mu3 and Mu50 by cDNA differential hybridization method. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 269, p.485–490, 2000.
- LAMAGNI, T.L.; POTZ, N.; POWELL, D.; PEBODY, R.; WILSON, J.; DUCKWORTH, G. Mortality in patients with meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia, England 2004-2005. **Journal of Hospital Infection**, v.77 p.16-20, 2011.
- LAMAITA, H.C.; CERQUEIRA, M.M.O.P.; CARMO, L.S.; SANTOS, D. A.; PENNA, C.F.A.M.; SOUZA, M.R. Contagem de *Staphylococcus* sp. e detecção de enterotoxinas estafilocócicas e toxina da síndrome do choque tóxico em amostras de leite cru refrigerado. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.57, n.5, p.702-709, 2005.
- LIMA, J.C. **Ocorrência de *Staphylococcus* sp. em ambiente hospitalar, caracterização de superfícies e adesão de *Staphylococcus aureus* em sondas nasoenterais de poliuretano e silicone.** Dissertação de mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007. 145p.
- MARQUES, S.C.; REZENDE, J.G.O. S.; ALVES, L.A.F.; SILVA, B.C.; ALVES, E.; ABREU, L.R.; PICCOLI, R.H. Formation of biofilms by *Staphylococcus aureus* on stainless steel and glass surfaces and its resistance to some selected chemical sanitizers. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.38, p.538-543, 2007.
- McCALLUM, N.; BERGER-BACHI, B.; SENN, M.M. Regulation of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Medical Microbiology**, v.300, p.118–129, 2010.
- MELO, P.C. **Estudo fenotípico e genotípico da produção de biofilmes por estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas dos casos de mastite subclínica bovina.** Dissertação de mestrado, UNESP, Jaboticabal, SP, 2008. 122p.
- MOLINA, P.D.S. **Eficácia de desinfetantes frente a bactérias sobreviventes a higienização em matadouros-frigoríficos de bovinos.** Dissertação de mestrado em Ciências Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária.Porto Alegre, 2009. 51p.

- MOMTAZ, H.; TAJBAKHS, E.; ABBASIAN, B.; MOMENI, M. Investigation of accessory gene regulator (*agr*) in *Staphylococcus aureus* isolated from clinical and subclinical bovine mastitis in Iran. **African Journal of Microbiology Research**, v. 4, n.6, p. 471-474, 2010.
- MOTAMEDI, H.; MIRZABEIGI, H.; SHIRALI, T. Determining of antibiotic resistance profile in *Staphylococcus aureus* isolates. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, p. 734-737, 2010.
- NOVICK, R.P.; SCHLIEVERT, P.; RUZIN, A. Pathogenicity and Resistance Islands of *Staphylococci*. **Microbes and Infection**, v. 3, p. 585-94, 2001.
- OMOE, K.; HU, D.; TAKAHASHI-OMOE, H.; NAKANE, A.; SHINAGAWA, K. Comprehensive analysis of classical and newly described staphylococcal superantigenic toxin genes in *Staphylococcus aureus* isolates. **FEMS Microbiology Letters**, v.246, p.191-198, 2005.
- OSHIDA, T.; SUGAI, M.; KOMATSUZAWA, H.; HONG, Y.; SUGINAKA, H.; TOMASZ, A.A. Staphylococcus aureus autolysin that has an N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase domain and an endo- β -N-acetylglucosaminidase domain: Cloning, sequence analysis, and characterization. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 92, p. 285-289, 1995.
- PELISSER, M.R.; KLEIN, C.S.; ASCOLI, K.R.; ZOTTI, T.R.; ARISI, A.C.M. Occurrence of *Staphylococcus aureus* and multiplex PCR detection of classic enterotoxin genes in cheese and meat products. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.40, p.145-148, 2009.
- PINHO, M. G.; LENCASTRE, H.; TOMASZ, A. Transcriptional Analysis of the *Staphylococcus aureus* Penicillin Binding Protein 2 Gene. **Journal of Bacteriology**, v.180, n. 23, p. 6077–6081, 1998.
- POMPERMAYER, D.M.C.; GAYLARDE, C.C. The influence of temperature on the adhesion of mixed cultures of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to polypropylene. **Food Microbiology**, v.17, p.361-365, 2000.
- POULSEN, L.V. Microbial biofilm in food processing. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, v.32, p.321-326, 1999.
- RAPINI, L.S.; CERQUEIRA, M.M.O.P. ; CARMO, L.S.; VERAS, J.F.; SOUZA, M.R. Presença de *Staphylococcus* spp. produtores de enterotoxinas e da toxina da síndrome do choque tóxico em manipuladores de queijo de cabra. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.57, n.6, p.825-829, 2005.
- REIPERT, A.; EHLERT, K.; KAST, T.; BIERBAUM, G. Morphological and genetic differences in two isogenic *Staphylococcus aureus* strains with decreased susceptibilities to vancomycin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 2, p. 568–576, 2003.
- ROTUN, S.S.; McMATH, V.; SCHOONMAKER, D.J.; MAUPIN, P.S.; TENOVER, F.C.; HILL, B.C.; ACKMAN, D.M. *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin isolated from a patient with fatal bacteremia. **Emerging Infectious Diseases**, v. 5, n. 1, p. 147-149, 1999.
- SANDEL, M.K.; MCKILLIP, J.L. Virulence and recovery of *Staphylococcus aureus* relevant to the food industry using improvements on traditional approaches. **Food Control**, v.15, p.5–10, 2004.

- SATORRES, S.E.; ALCARÁZ, L.E. Prevalence of *icaA* and *icaD* genes in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* strains isolated from patients and hospital staff. **Central European Journal of Public Health**, v.15, n.2, p.87–90, 2007.
- SHALE, K.; LUES, J.F.R.; VENTER, P.; BUYS, E.M. The distribution of *Staphylococcus* sp. on bovine meat from abattoir deboning rooms. **Food Microbiology**, v.22, p.433-438, 2005.
- SOUZA, M.V.; REIS, C.; PIMENTA, F.C. Revisão sobre a aquisição gradual de resistência de *Staphylococcus aureus* aos antimicrobianos. **Revista de Patologia Tropical**, v.34, n.1, p. 27-36, 2005.
- STANLEY, N.R.; LAZAZZERA, B.A. Environmental signals and regulatory pathways that influence biofilm formation. **Molecular Microbiology**, Oxford, v.52, n.4, p.917-924, 2004.
- TALLENT, S.M.; BISCHOFF, T.; CLIMO, M.; OSTROWSKY, B.; WENZEL, R. P.; EDMOND, M.B. Vancomycin susceptibility of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates causing nosocomial bloodstream infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 6, p. 2249–2250, 2002.
- TAVARES, W. Bactérias gram-positivas problemas: 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.
- VASUDEVAN, P.; NAIR, M.K.M.; ANNAMALAI, T.; VENKITANARAYANAN, K.S. Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. **Veterinary Microbiology**, n.92 p.179–185, 2003.
- VOJTOV, N.; ROSS, H.F.; NOVICK, R.P. Global repression of exotoxin synthesis by staphylococcal superantigens. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 15, p. 10102-10107, 2002.
- YAZDANI, R.; OSHAGHI, M.; HAVAYI, A.; PISHVA, E.; SALEHI, R.; SADEGHIZADEH, M.; FOROOHESH, H. Detection of *icaAD* gene and biofilm formation in *Staphylococcus aureus* isolates from wound infections. **Iranian Journal of Public Health**, v. 35, n. 2, p.25-28, 2006.
- ZOLL, S.; PÄTZOLD, B.; SCHLAG, M.;GÖTZ, F.; KALBACHER, H.; STEHLE, T. Structural Basis of cell wall cleavage by a staphylococcal autolysin. **PLoS Pathogens**, v.6, n. 3, p.1-13, 2010.

CAPÍTULO II

CARACTERIZAÇÃO DE ESTIRPES DE *Staphylococcus* ISOLADAS EM UMA UNIDADE DE ABATE DE AVES

RESUMO

Staphylococcus aureus é um patógeno que pode estar presente na superfície de carcaças de animais e tem acesso à planta de abate da indústria por meio de animais vivos, o que pode vir a comprometer a qualidade do produto final. Desta forma, este trabalho teve por objetivo caracterizar estirpes de *Staphylococcus* isoladas de diferentes nichos em uma unidade de abate de frango de corte. De um total de 120 isolados, 75 foram considerados como típicos do gênero *Staphylococcus*, sendo 63,7 % coagulase positiva e 37,3 % coagulase negativa. Pela técnica de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) confirmou-se que 86,67 % dos isolados eram pertencentes ao gênero *Staphylococcus* pela detecção do gene *tuf* e 77,33 % da espécie *S. aureus* pela amplificação do gene *nuc*. Verificou-se a presença do gene *sec* em duas das estirpes, sendo uma delas estafilococos coagulase negativa. A maioria dos isolados foram resistentes à sulfonamida (98,5 %), ácido nalidíxico (89,3 %) e penicilina G (87,70 %). Dentre os isolados resistentes à penicilina 4,60 % foram oxacilina resistentes e 1,5 % vancomicina resistentes.

Palavras-chave: *Staphylococcus aureus*, coagulase, unidade de abate de aves, resistência microbiana.

1. Introdução

A carne e seus derivados tem sido frequentemente implicados como veículos da transmissão de patógenos para humanos. Entre as bactérias patogênicas, *Staphylococcus aureus* podem estar presentes na superfície de carcaças de animais, e acessam na planta de abate da indústria a partir dos animais vivos (LIMA et al., 2004).

Embora o reservatório primário de *S. aureus* seja a pele e membranas mucosas de mamíferos e pássaros, esta bactéria também pode estar presente no solo, água, poeira e ar, sendo que a introdução destes em abatedouros pode ocorrer por meio das mãos dos manipuladores, na etapa de remoção do couro e durante a evisceração. Estudos mostram que, aproximadamente 50 % da população humana é portadora assintomática de *S. aureus* (GUNDOGAN et al., 2005; MOLINA, 2009).

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

Além disso, algumas estirpes de *S. aureus* destacam-se por apresentarem uma grande versatilidade nos seus mecanismos de resistência aos antimicrobianos, e emergem assim como uma das maiores causas de infecções nosocomiais e até mesmo comunitárias (CORDEIRO, 2004).

Para a detecção e caracterização deste tipo de bactéria patogênica em alimentos, testes morfológicos e bioquímicos são usados de maneira confiável e eficiente, mas podem não expressar todas as propriedades fenotípicas das bactérias. Assim, técnicas moleculares também são aplicadas na identificação de patógenos e são fundamentadas em características estáveis em relação ao DNA cromossômico, plasmidial ou total, o que permite melhor sensibilidade e interpretação dos resultados (GANDRA et al., 2008).

Ao considerar que muitas das etapas do processamento de carnes são realizadas manualmente e que os cortes podem ficar expostos sobre as mais

variadas superfícies, este trabalho teve por objetivo isolar e caracterizar por métodos fenotípicos e genotípicos estirpes de *Staphylococcus spp.* isoladas de uma unidade de abate de frango de corte.

2. Material e métodos

2.1. Coleta de amostras e metodologia de análise

Em uma unidade de abate de frango de corte sob regime de Inspeção Federal (SIF), foram coletadas amostras em cinco diferentes pontos da superfície ao longo da calha de evisceração, cinco diferentes utensílios (facas e chairas), mãos de vinte manipuladores e dez amostras de carcaças de frango (cinco antes da entrada no pré-*chiller* e cinco após a saída do *chiller*), o que totalizou quarenta amostras. Para a coleta de amostras de superfícies, utensílios e mãos foi utilizada a técnica de esfregaço com auxílio de *swab*, de acordo com a metodologia adaptada por Andrade (2008), o qual o *swab* foi mergulhado em caldo TSB. Para superfícies utilizou-se uma área delimitada de 250 cm² e para utensílios e mãos o *swab* foi realizado por unidade. Para coleta das amostras de carcaças de frango usou-se a técnica de rinsagem recomendada pelo Foods and Drugs Administration (FDA, 1996), em que a carcaça foi colocada em saco plástico esterilizado adicionado de 400 mL de tampão fosfato estéril. Após a rinsagem com o tampão, 30 mL do fluido foi utilizado para análise.

2.2. Isolamento das estirpes

As estirpes foram isoladas conforme descrito na Instrução Normativa n° 62 (BRASIL, 2003). Primeiramente, plaqueou-se 1 mL da diluição 10⁻¹ de cada amostra coletada em ágar Baird-Parker (micro MED[®]) suplementado com solução de gema de ovo e 0,05 % de telurito de potássio. Foram isoladas de cada placa três colônias típicas (cor preta com halo translúcido) e atípicas. As colônias foram estriadas e mantidas em Ágar Padrão para Contagem (PCA, Difco[™]). Posteriormente, realizou-se a prova de coagulase, teste de catalase e coloração de Gram (BRASIL, 2003).

A partir das colônias mantidas em PCA, semeou-se cada colônia em tubos contendo 3 mL de caldo infusão de cérebro e coração (BHI, Himedia[®]) e incubou-se a 36 °C ± 1 °C, por 24 horas. Após incubação, transferiu-se 0,3 mL de cada tubo de cultivo em BHI para tubos esterilizados contendo 0,3 mL de plasma de coelho. Após 4 a 6 horas de incubação a 36 °C ± 1 °C verificou-se a formação de coágulo, a fim de constatar se o isolado produzia a enzima coagulase.

Para verificação da produção de catalase pelos isolados, adicionou-se 1 gota de peróxido de hidrogênio 3 % em uma colônia isolada e observou-se a formação de bolhas, resultado associado a liberação de oxigênio em função da degradação enzimática do peróxido de hidrogênio.

Em relação à coloração de Gram, preparou-se o esfregaço, corou-se conforme o método de Gram e observou-se em microscópio óptico Olympus CX40 a presença de cocos gram-positivos.

2.3. Extração do DNA genômico para ensaios fundamentados em PCR

Os isolados de *Staphylococcus* spp. foram incubados em estufa B.O.D. (Fanem[®]) a 37 °C, por 18 horas em 5 mL de caldo BHI (Himedia[®]). O DNA dos isolados foi extraído a partir de um mililitro da cultura bacteriana que foi centrifugado (Jouan[®] CR3i) a 12000 x g a 4 °C por 2 minutos. O sobrenadante foi descartado e, ao sedimento, adicionou-se 60 µL de solução de lise (sacarose 20 %, Na₂HPO₄ 0,01 mol.L⁻¹, pH 7,0) e lisozima (USB[®]) (0,1 g.mL⁻¹ acrescentada no momento da extração) com incubação a 37 °C por 1 hora em banho-maria. Decorrido este tempo, adicionou-se 3 µL de proteinase K (Sigma[®]) (20 mg.mL⁻¹), 507 µL de tampão TE 10:1 (Tris-HCl 10 mmol.L⁻¹, pH 7,5; EDTA 1 mmol.L⁻¹), 30 µL de SDS (Amresco[®]) 10 %, misturou-se e incubou-se a 37 °C por 30 minutos. Posteriormente, adicionou-se 5 µL de RNase (Sigma[®]) e incubou-se a 25 °C por 2 minutos, e então acrescentou-se 100 µL de NaCl (Vetec[®]) 5 mol.L⁻¹, 80 µL de hexadeciltrimetilamônio (CTAB (SIGMA[®]) 2 %: NaCl 0,7 M (1:1) e incubou-se a 65 °C por 10 minutos. Em seguida, foram adicionados 750 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), e a suspensão foi agitada por 1 minuto e centrifugada (Jouan[®]) a 12000 x g por 15 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro tubo, ao qual foi adicionado 750 µL de

clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) seguido de centrifugação por 10 minutos. O sobrenadante foi novamente transferido para outro microtubo, sendo adicionado de aproximadamente 500 µL de isopropanol 100 % e armazenado a -20 °C por 18 horas. Após este período, fez-se uma nova centrifugação a 12000 x g por 15 minutos e descartou-se o sobrenadante. Adicionou-se 1,5 mL de etanol 75 %, misturou-se levemente por 5 minutos, centrifugou-se novamente por 2 minutos, descartou-se o sobrenadante. Este procedimento foi repetido por duas vezes. O centrifugado foi seco em estufa à 37 °C por 5 min (Fanem[®]), e então adicionou-se 100 µL de tampão TE 10:1 (Tris-HCl 10 mmol.L⁻¹, pH 7,5; EDTA 1mmol.L⁻¹). O DNA foi quantificado em espectrofotômetro a 260 nm (NanoDrop[®]).

2.4. Identificação de gênero e espécie de *Staphylococcus* por PCR

As sequências dos oligonucleotídeos foram sintetizadas pela Sigma, Brasil (Tabela 1). As reações de PCR-Uniplex para a pesquisa dos genes *tuf*, *nuc*, *sea*, *seb*, *sec* e *sed* foram realizadas separadamente para detecção do gênero *Staphylococcus*, espécie *S. aureus*, toxina tipo A, toxina tipo B, toxina tipo C e toxina tipo D, respectivamente. A mistura da reação consistiu de 0,4 µM de cada oligonucleotídeo, 0,3 µM de dNTP, 1,5 mM do MgCl₂, tampão da enzima Taq DNA polimerase (Promega) na concentração de 1x, 50 ng do DNA genômico e 1 U de Taq DNA polimerase (Promega) para um volume final de 25 µL. As amplificações foram realizadas em termociclador (THERM 1000/Maxygene), obedecendo-se a sequência de desnaturação inicial a 94 °C por 5 minutos, seguido por 30 ciclos térmicos, cada um consistindo de 94 °C por 30 segundos, 55 °C por 30 segundos, 72 °C por 30 segundos e, posteriormente, com uma etapa de extensão final a 72 °C por 5 minutos. Para a amplificação dos genes *sea* e *seb* usou-se temperatura de anelamento de 57 °C e manteve-se as demais condições. Como controle positivo deste experimento utilizou-se estirpes de referência de *S. aureus* (Tabela 2).

Tabela 1 - Sequências dos oligonucleotídeos utilizados

Genes	Sequencia (5' - 3')	Identificação	Referências
<i>tuf</i>	F - GGC CGT GTT GAA CGT GGT CAA ATC A R - TIA CCA TTT CAG TAC CTT CTG GTA A	Gênero <i>Staphylococcus</i>	MARTINEAU et al., 2001
<i>nuc</i>	F - CAA GGC TTG GCT AAA GTT GC R - CTG AAT CAG CGT TGT CTT CG	Espécie <i>S. aureus</i>	POLI et al., 2007.
<i>sea</i>	F - CCT TTG GAA ACG GTT AAA ACG R - TCT GAA CCT TCC CAT CAA AAA C	Toxina A	BECKER et al., 1998
<i>seb</i>	F - TCG CAT CAA ACT GAC AAA CG R - GCA GGT ACT CTA TAA GTG CCT GC	Toxina B	BECKER et al., 1998
<i>sec</i>	F - CTC AAG AAC TAG ACA TAA AAG CTA GG R - TCA AAA TCG GAT TAA CAT TAT CC	Toxina C	BECKER et al., 1998
<i>sed</i>	F - CTA GTT TGG TAA TAT CTC CTT TAA ACG R - TTA ATG CTA TAT CTT ATA GGG TAA ACA TC	Toxina D	BECKER et al., 1998

Tabela 2 - Controles positivos de *Staphylococcus aureus* utilizados

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

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

2.5. Sensibilidade dos isolados a antimicrobianos

Os isolados de *Staphylococcus* spp. foram submetidos ao teste de antibiograma por meio da técnica de difusão em disco de acordo com a metodologia descrita por Bauer et al. (1966), o qual as culturas foram incubadas a 37 °C até atingir densidade óptica 0,5 medida em espectrofotômetro (Biospectro) com comprimento de onda de 640 nm, em seguida com o auxílio de um *swab* cada cultura foi semeada em Agar Mueller-Hinton (Difco™) e utilizou-se os seguintes discos impregnados com antibióticos: ácido clavulânico + amoxicilina (30 µg), ácido nalidíxico (30 µg), ampicilina (10 µg), cefalotina (30 µg), cefoxitina (30 µg), ciprofloxacina (5 µg), clindamicina (2 µg), cloranfenicol (30 µg), eritromicina (15 µg), estreptomicina

(10 µg), gentamicina (10 µg), oxacilina (1 µg), penicilina G (10 U), rifampicina (5 µg), sulfonamida (300 µg), tetraciclina (30 µg) e vancomicina (30 µg). Os diâmetros das zonas de inibição foram interpretados após 24 h de incubação a 37 °C, de acordo com o Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2007).

3. Resultados e discussão

3.1. Identificação bioquímica e molecular

Foram isoladas 120 colônias típicas e atípicas em Ágar Baird-Parker, das quais após realização de provas bioquímicas 75 foram identificadas como típicas de *Staphylococcus* spp. (Tabela 3). Observou-se que um maior número de isolados foi originário de manipuladores, o que demonstrou sua importância como fonte de contaminação cruzada entre as carcaças na linha de abate. Facas e chairas devem ser esterilizadas após o uso em cada carcaça, apesar desta prática ser adotada no estabelecimento avaliado, ainda foi possível isolar colônias típicas nesses utensílios, o que enfatiza a necessidade de rigor nesta prática. Na calha de evisceração também foi possível isolar colônias típicas do patógeno em número relativamente baixo, o que pode ser devido à lixívia e arraste pela água que flui constantemente pela calha. Não foi possível isolar colônias típicas em carcaças após resfriamento em chiller, apesar de terem sido isoladas nas carcaças avaliadas antes da entrada neste. Isto se deve provavelmente pela lixívia provocada pela água de resfriamento.

Tabela 3 - Ocorrência de isolados de *Staphylococcus* spp. provenientes de diferentes nichos em um indústria de abate de aves

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

Observou-se predominância de isolados coagulase positiva originários de manipuladores, utensílios e carcaças (Tabela 3). Enquanto que nas amostras de superfície houve um equilíbrio nesta característica fenotípica entre os isolados (Tabela 3).

A pesquisa da enzima coagulase é importante por indicar potencial de virulência, o qual protege as células da fagocitose, uma vez que esta enzima é responsável pelo revestimento das células bacterianas por estar presente na superfície da parede celular e associar-se com a conversão direta de fibrinogênio em fibrina (SANDEL e McKILLIP, 2004). Este fato torna-se preocupante no que se concerne à falta de práticas higiênico-sanitárias adequadas, sendo necessária a adoção de boas praticas de fabricação para prevenir contaminações e intoxicação alimentar.

Entretanto o envolvimento de estafilococos coagulase negativa em surtos de toxinfecção alimentar é descartado em estudos (SILVA e GANDRA, 2004; BRITO et al., 2006), o que demonstra também a necessidade de uma identificação acurada dos isolados típicos do gênero *Staphylococcus*.

Dos 75 isolados típicos pelas provas bioquímicas, 65 (86,6 %) foram confirmados por PCR como do gênero *Staphylococcus* e 58 (77,33 %) foram identificados como *S. aureus*. O produto da amplificação mensurado no *software* Quantum ST4 apresentou-se com aproximadamente 470 pb para o gene *tuf* (Figura 1A), resultado diferente do constatado por Martineau et al. (2001) que para este mesmo gene observou produto de amplificação de 370 pb. Provavelmente esta divergência deve-se ao fato das diferentes condições utilizadas para amplificação do gene *tuf* no presente trabalho em relação ao trabalho apresentado por Martineau et al. (2001). Dos 65 isolados positivos na amplificação para o gene *tuf*, 58 apresentaram produto amplificado de 240 pb para o gene *nuc* (Figura 1B), o que permitiu confirmar a identificação como *S. aureus*.

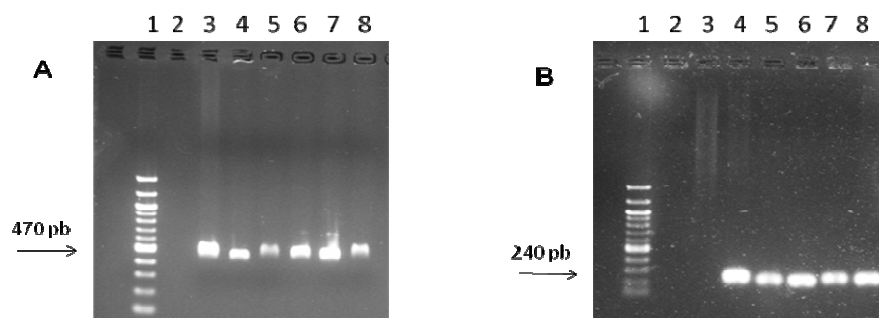


Figura 1 - Identificação molecular de estirpes de *Staphylococcus* spp. A – Identificação molecular do gênero *Staphylococcus* spp. pela amplificação do gene *tuf*, linha 1: marcador de peso molecular 100 pb (BioLabs®); linha 2: controle negativo; linhas 3-7: resultados positivos; linha 8: controle positivo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

A constatação de uma ocorrência alta de *S. aureus* pode ser devida a contaminações frequentes durante o abate, preparação e evisceração das carcaças pelos manipuladores. Com a confirmação da espécie por PCR observou-se maior número de isolados de *S. aureus* provenientes de carcaças e manipuladores (Tabela 4).

Tabela 4 - Prevalência de *Staphylococcus* spp. e *Staphylococcus aureus* de acordo com a origem

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

^amãos de manipuladores do abatedouro de aves; ^bsuperfícies (calha) de aço inoxidável AISI 304 tipo 4; ^ccarcaças de frango; ^dfacas e chairas utilizadas no abatedouro de aves.

Dentre as 58 estirpes de *S. aureus* 70,7 % foram identificadas como coagulase positiva e 29,3 % como coagulase negativa. A identificação de *S. aureus* coagulase negativa neste estudo ressalta a importância da pesquisa deste micro-organismo em alimentos, o que confirma que não se pode caracterizar apenas a espécie *S. aureus* como produtora de coagulase, uma vez que dentro do gênero outras espécies também são capazes de produzir a

enzima coagulase, como *Staphylococcus delphini*, *Staphylococcus hycus*, *Staphylococcus intermedius* e *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans* (JAY, 2005).

Brabes (2005) ao identificar *Staphylococcus* spp. isolados de manipuladores, superfícies e ar de ambientes de uma indústria de laticínios, constatou que 65,7 % dos isolados foram coagulase negativa e 34,3 % coagulase positiva em um total de 137 estirpes, e dentre os isolados coagulase negativa 5,5 % foram identificados como *S. aureus*.

Fox et al. (1996) também reportaram o isolamento de estirpes de *S. aureus* produtores de pouca ou nenhuma coagulase, portanto classificadas como estafilococos coagulase negativa. Esses autores ressaltaram que os métodos genotípicos empregados para a identificação dessas estirpes confirmaram as identificações fenotípicas, o que excluiu qualquer possibilidade de erro. A enumeração de apenas estafilococos coagulase positiva em alimentos pode subestimar o grau de contaminação por *Staphylococcus* potencialmente enterotoxigênicos. Em outros estudos foi identificado o potencial toxigênico de estafilococos coagulase negativa (VERNOZY-ROZAND et al., 1996; CARMO et al., 2002; LAMAITA et al., 2005; CUNHA et al., 2006; ÇEPOĞLU et al., 2010; RALL et al., 2010).

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

Entretanto, mesmo que a incidência de genes toxigênicos nas estirpes avaliadas tenha sido baixa, ainda há uma preocupação a respeito de linhagens virulentas entre os isolados, pois a identificação molecular em nível de espécie de *S. aureus* permitiu uma rápida detecção de um grande número de estirpes com a presença do gene *nuc*, que codifica a produção de termonuclease responsável pela clivagem do DNA ou RNA do hospedeiro (GANDRA, 2003).

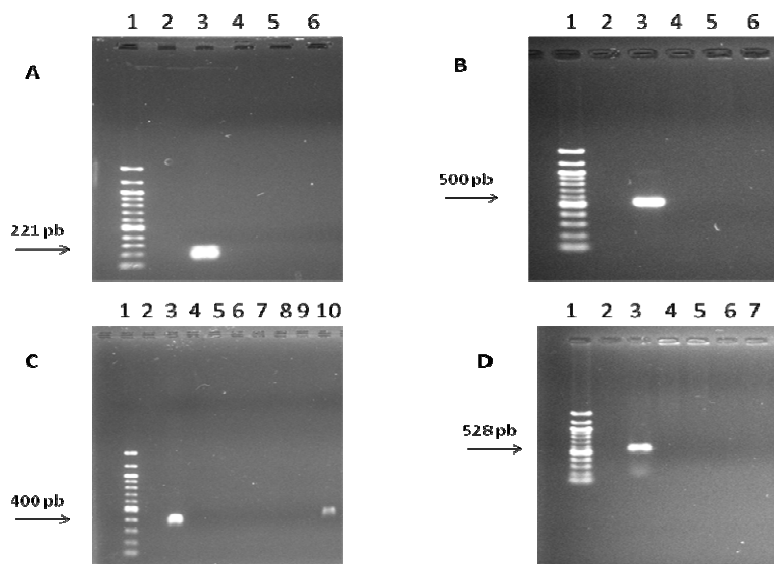


Figura 2 - Identificação molecular de genes toxigênicos. A – Identificação molecular do gene *sea* em *S. aureus*, linha 1: marcador de peso molecular 100 pb (BioLabs®); linha 2: controle negativo; linha 3: controle positivo *S. aureus* (ATCC 8095); linhas 4-6: resultados negativos. B – Identificação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

3.2. Perfil de sensibilidade/resistência de *Staphylococcus* spp. à antimicrobianos

Dentre as estirpes avaliadas 87,70 % foram resistentes à penicilina G (Figura 3). Penicilina é uma denominação genérica de um amplo grupo de antibióticos, tais como penicilina G, penicilina V, oxacilina, diicloxacilina, nafcilina, ampicilina, amoxicilina, ticarcilina e piperacilina, os quais são antibióticos classificados como β -lactâmicos que inibem a síntese da parede celular (REESE et al., 2002). O espectro desses antimicrobianos inclui bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. Este alto índice de resistência das estirpes isoladas à penicilina G pode ser explicado pelo baixo espectro de atividade e sensibilidade deste antibiótico às enzimas produzidas principalmente por *S. aureus*, as penicilinases (TAVARES, 2001). Este resultado também indica o uso indiscriminado deste antibiótico, o que possivelmente tem sido responsável pela seleção de linhagens resistentes, não sendo mais indicado o uso deste antimicrobiano para o tratamento de infecções estafilocócicas.

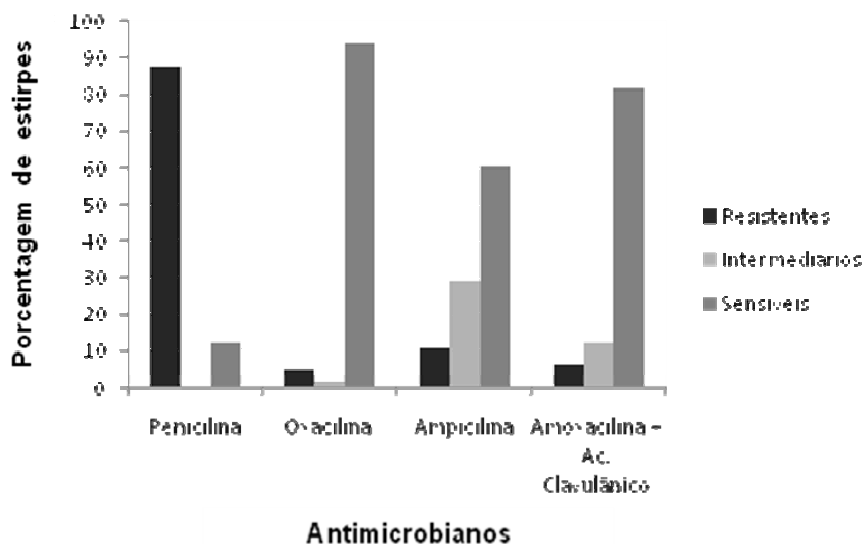


Figura 3 - Porcentagem de estirpes de *Staphylococcus* spp. sensíveis/resistentes aos antimicrobianos do grupo β -lactâmicos.

Penicilinas semi-sintéticas foram desenvolvidas a fim de inibir a ação das penicilinas, o que pode ser ilustrado com os resultados do presente estudo, em que 93,85 % das estirpes foram sensíveis à oxacilina e 60,0 % à ampicilina (Figura 3). Entretanto, já existem muitas estirpes de *S. aureus* resistentes à oxacilina, isoladas de ambientes relacionados aos serviços da saúde e na comunidade (GRANDO et al., 2008). No presente estudo, 4,61 % das linhagens foram resistentes à oxacilina (Figura 3), entretanto outros trabalhos relataram uma maior porcentagem de resistência (MOREIRA et al., 1998; TAVARES, 2000; FARIA, 2009).

O uso combinado de β -lactâmicos com outro agente antibacteriano que inibe a ação de β -lactamases tem sido efetivo contra estirpes do gênero *Staphylococcus*. Observou-se no presente estudo que 81,54 % dos isolados foram sensíveis a ácido clavulânico mais amoxicilina (Figura 3).

As cefalosporinas fazem parte do grupo dos cefens e possuem boa ação sobre *S. aureus* produtores de penicilinas. O seu mecanismo de ação é semelhante ao mecanismo das penicilinas por interferirem na síntese da parede celular. Elas são divididas em quatro categorias de acordo com o espectro de atividade. Aquelas de primeira geração incluem as cefalotinas que apresentam boa atividade sobre bactérias Gram-positivas, porém menor ação sobre estirpes de *S. aureus* oxacilina ou meticilina resistente (REESE et al.,

2002). Todas as estirpes foram sensíveis à cefalotina, inclusive as ORSA (Tabela 5). As cefalosporinas de segunda geração compreendem as cefoxitinas que possuem maior atividade sobre bactérias Gram-negativas comparadas as cefalotinas. Dentre os isolados 95,4 % foram sensíveis a esse antibiótico.

Os glicopeptídeos são um grupo de agentes antimicrobianos que possuem ação direcionada a bactérias Gram-positivas, por exemplo, a vancomicina que passou a ser utilizada como um dos últimos recursos para tratar infecções causadas por estirpes ORSA (GRANDO et al, 2008), porém a prescrição deste antibiótico é cada vez mais frequente, muitas vezes de forma indiscriminada, o que contribui para a emergência de *S. aureus* resistentes a vancomicina (VRSA). No presente estudo, 1,5 % das estirpes foram resistentes à vancomicina (Tabela 5). No entanto, dentre as estirpes ORSA nenhuma foi VRSA, assim não foi detectada nenhuma co-relação de resistência entre essas estirpes.

A eritromicina faz parte do grupo dos macrolídios, em geral possui ação bacteriostática, mas de acordo com as condições podem ser bactericidas. Possuem boa atividade sobre micro-organismos Gram-positivos e Gram-negativos e agem sobre a inibição da síntese protéica (REESE et al., 2002). Observou-se que 21,55 % e 52,30 % dos isolados foram resistentes e resistentes intermediários à eritromicina (Tabela 5).

Outro antibiótico muito utilizado é a tetraciclina associado às suas propriedades farmacocinéticas superiores, menor toxicidade, tolerância aumentada e menor custo. Este antibiótico age como bacteriostático por inibir a síntese protéica em nível de ribossomo em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (REESE et al, 2002). Um percentual de 70,77 % das estirpes foram sensíveis à tetraciclina (Tabela 5), o que representa boa atividade, uma vez que é um dos antibióticos mais prescritos em todo o mundo.

Outros inibidores da síntese protéica testados incluíram a gentamicina, cloranfenicol, rifampicina, clindamicina, e estreptomina, que apresentaram 93,85 %, 86,15 %, 83,10 %, 73,85 % e 27,70 % de sensibilidade, respectivamente (Tabela 5).

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

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

Tabela 5 - Porcentagem de estirpes de *Staphylococcus* sensíveis/resistentes à diferentes antimicrobianos testados

Antibióticos	Sensíveis (%)	Intermediários (%)	Resistentes (%)
Ác. Nalidíxico	1,50	9,20	89,3
Cefalotina	100	-	-
Cefoxitina	95,40	3,06	1,54
Ciprofloxacina	85,15	7,70	6,15
Clindamicina	73,85	20,0	6,15
Cloranfenicol	86,15	13,85	-
Eritromicina	26,15	52,30	21,55
Estreptomicina	27,70	41,53	30,77
Gentamicina	93,85	6,15	-
Rifampicina	83,10	4,60	12,30
Sulfonamida	1,50	-	98,50
Tetraciclina	70,77	13,83	15,40
Vancomicina	98,5	-	1,50

Faria (2009) constatou resistência à oxacilina (13,2 %), gentamicina (35,2 %), tetraciclina (65,9 %), rifampicina (45,1 %) e clindamicina (60,4 %), entre isolados de *S. aureus* isolados de ambiente hospitalar. Estes resultados são diferentes dos observados neste estudo, uma vez que a maioria das estirpes foram sensíveis aos antimicrobianos acima citados. Essa diferença pode ser associada devido ao uso constante de drogas antimicrobianas para tratamento de infecções estafilocócicas no ambiente hospitalar comparado com a restrição do uso de antibióticos na indústria de alimentos.

Entretanto, mesmo que a maioria dos antimicrobianos testados tenha apresentado alta eficácia, deve-se atentar para o uso indiscriminado a fim de evitar a seleção de bactérias resistentes. Foram constatadas 23 (35,4 %) estirpes resistentes a quatro ou mais antimicrobianos simultaneamente (Tabela 6).

Tabela 6 – Resistência simultânea de *Staphylococcus* spp. a quatro ou mais antimicrobianos testados

Antimicrobianos	Número de estirpes	Porcentagem (%)
Ácido nalidíxico	23	100
Amox. + ácido clavulânico	4	17,4
Ampicilina	5	21,7
Cefoxitina	1	4,3
Ciprofloxacina	1	8,7
Clindamicina	1	4,3
Eritromicina	11	47,8
Estreptomicina	12	52,2
Oxacilina	1	4,3
Penicilina G	22	95,6
Rifampicina	6	26,1
Sulfonamida	23	100
Tetraciclina	6	26,1
Vancomicina	1	4,3

Ressalta-se que dentre os 17 antibióticos testados, houve resistência simultânea em quatorze (Tabela 6), por esse motivo reforça-se a necessidade do conhecimento do perfil de sensibilidade/resistência das bactérias que mais frequentemente são associadas a infecções e do modo de disseminação dessa resistência, principalmente devido ao fato dos alimentos serem potenciais fontes de origem de *Staphylococcus* spp., o que pode gerar casos ou surtos de intoxicações estafilocócicas e dificultar o tratamento dessas intoxicações.

4. Conclusão

Foi possível isolar e caracterizar uma alta porcentagem de estirpes do gênero *Staphylococcus* em todos os nichos avaliados por meio do uso de métodos fenotípicos. A técnica de PCR permitiu uma rápida identificação e

confirmação tanto de estirpes do gênero *Staphylococcus* quanto da espécie *S. aureus*, inclusive linhagens toxigênicas.

Diante disto, ressalta-se a importância do controle deste micro-organismo na indústria de alimentos, pois este serve como indicador higiênico-sanitário, visto que de acordo com o presente estudo os manipuladores constituíram-se como a principal fonte de veículo deste micro-organismo. Sendo, portanto, necessário a implementação e padronização de medidas de controle que incluem técnica de higienização, treinamento e conscientização dos profissionais envolvidos na produção alimentos.

5. Referências

ANDRADE, N.J. **Higiene na indústria de alimentos: avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos**. São Paulo: Varela, 2008, 412p.

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

BECKER, K.; ROTH, R.; PETERS, G. Rapid and specific detection of toxigenic *Staphylococcus aureus*: use of two multiplex PCR enzyme immunoassays for amplification and hybridization of staphylococcal enterotoxin genes, exfoliative toxin genes, and toxic syndrome toxin 1 gene. **Journal of Clinical Microbiology**, v.36, p. 2548-2553, 1998.

BRABES, K.C.S. **Identificação e capacidade de adesão de *Staphylococcus* spp. Isolados de manipuladores, superfícies e ar de ambientes de uma indústria de laticínios**. Tese de doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2005. 80p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Secretaria de Defesa Agropecuária, Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Instrução Normativa n° 62, de 26 de agosto de 2003. Aprova os métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água. **Diário Oficial da União**.

BRITO, D.V.D.; OLIVEIRA, E.J.; DARINI, A.L.C.; ABDALLAH, V.O.S.; FILHO, P. P.G. Outbreaks associated to bloodstream infections with *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative *Staphylococcus* spp in premature neonates in a university hospital from Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.37, p.101-107, 2006.

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

ÇEPOĞLU, H.; VATANSEVER, L.; BILGE ORAL, N. Isolation of Staphylococci from Food Handlers and Investigation of Their Enterotoxigenicity and Susceptibility to Some Antibiotics. **Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi**, v.16, p. S1-S5, 2010.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Performance Standard for Antimicrobial Susceptibility Testing**, Tables M100 - S17, 2007.

CORDEIRO, R.P. **Estudo do perfil de sensibilidade/resistência de cepas de *Staphylococcus aureus* MRSA do Hospital das Clínicas de Pernambuco**. Dissertação de mestrado em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2004. 87p.

CUNHA, M.L.R.S.; PERESI, E.; CALSOLARI, R.A.O.; ARAÚJO JÚNIOR, J.P. Detection of enterotoxins genes in coagulase-negative staphylococci isolated from foods. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.37, p.70-74, 2006.

FARIA, S.T. ***Staphylococcus aureus* entre estudantes de enfermagem saudáveis**. Dissertação de Mestrado em Enfermagem, Universidade Estadual de Maringá. Maringá, 2009. 58p.

FDA - US DEPARTMENT OF AGRICULTURE. Food Safety and Inspection Service. Pathogen reduction: hazard analysis and critical point (HACCP) systems final rules. **Federal Register**. Washington, v.61, p. 38940-38941, 1996.

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

FREITAS, M.F.L.; LEÃO, A.E.D.S.; STAMFORD, T.L.M.; MOTA, R.A. Ocorrência de *Staphylococcus aureus* em carcaças de frango. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v.22, n.2, p.271-282, 2004.

GANDRA, E.A.; GANDRA, T.K.V.; MELLO, W.S.; GODOI, H.S. Técnicas moleculares aplicadas à microbiologia de alimentos. **Acta Scientiarum Technology**, v.30, n.1, p.109-118, 2008.

GANDRA, E.A. **Identificação de *Staphylococcus aureus*, *S. intermedius* e *S. hyicus* através de testes bioquímicos e da amplificação por PCR de seqüências dos genes *coa* e *nuc***. Dissertação de mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial da Faculdade de Agronomia "Eliseu Maciel" da Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2003. 102p.

GRANDO, W.F.; SCAPIN, D.; MALHEIROS, P.S.; ROSSI, E.M.; TONDO, E.C. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from handlers of dairy industry. **Alimentos e Nutrição**, v.19, n.4, p. 467-471, 2008.

GUNDOGAN, N.; CITAK, S.; YUCEL, N.; DEVREN, A. A note on the incidence and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from meat and chicken samples. **Meat Science**, v.69, p. 807-810, 2005.

JAY, J.M. **Microbiologia de alimentos**. 6^ª edição. Porto Alegre: Artmed, 2005. 771p.

LAMAITA, H.C.; CERQUEIRA, M.M.O.P.; CARMO, L.S.; SANTOS, D.A.; PENNA, C.F.A.M.; SOUZA, M.R. Contagem de *Staphylococcus* sp. e detecção de enterotoxinas estafilocócicas e toxina da síndrome do choque tóxico em amostras de leite cru refrigerado. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.57, n.5, p.702-709, 2005.

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.S. Isolamento de *Salmonella* sp e *Staphylococcus aureus* no processo do abate suíno como subsídio ao sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle – APPCC. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.24, n.4, p. 185-190, 2004.

MARTINEAU, F., PICARD, F.J., KE, D., PARADIS, S., ROY, P.H., OUELLETTE, M.; BERGERON, M.G. Development of a PCR assay for identification of staphylococci at genus and species levels. **Journal of Clinical Microbiology**, v.39, p. 2541–2547, 2001.

MOLINA, P.D.S. **Eficácia de desinfetantes frente a bactérias sobreviventes a higienização em matadouros-frigoríficos de bovinos**. Dissertação de mestrado em Ciências Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária. Porto Alegre, 2009. 51p.

MOREIRA, M.; MEDEIROS, E.A.S.; PIGNATARI, A.C.C.; WEY, S.B.; CARDO, D.M. Efeito da infecção hospitalar da corrente sanguínea por *Staphylococcus aureus* resistente à oxacilina sobre a letalidade e o tempo de hospitalização. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.44, n.4, p. 263-268, 1998.

POLI, A.; GUGLIELMINI, E.; SEMBENI, S.; SPIAZZI, M.; DELLAGLIO, F.; ROSSI, F.; TORRIANI, S. Detection of *Staphylococcus aureus* and enterotoxin genotype diversity in Monte Veronese, a Protected Designation of Origin Italian cheese. **Letters in Applied Microbiology**, v.45, p.529–534, 2007.

RALL, V.L.M.; SFORCIN, J.M.; AUGUSTINI, V.C.M.; WATANABE, M.T.; FERNANDES JR., A.; RALL, R.; SILVA, M.G.; ARAÚJO JR., J.P. Detection of enterotoxin genes of *Staphylococcus* sp isolated from nasal cavities and hands of food handlers. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.41, p.59-65, 2010.

REESE, R.E.; BETTS, R.F.; GUMUSTOP, B. **Manual de antibióticos**. 3ed. Tradução por Penildon Silva. Rio de Janeiro: Editora Médica e Científica, 2002. 720p.

SANDEL, M.K.; MCKILLIP, J.L. Virulence and recovery of *Staphylococcus aureus* relevant to the food industry using improvements on traditional approaches. **Food Control**, v.15, p.5–10, 2004.

SILVA, W. P.; GANDRA, E. A. Estafilococos coagulase positiva: patógenos de importância em alimentos. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v.18, n.122, p.32-40, 2004.

TAVARES, W. **Manual de Antibióticos e Quimioterápicos Antiinfeciosos**, 3ed. São Paulo: Atheneu, 2001.

TAVARES, W. Bactérias gram positivas problemas: 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.

VERNOZY-ROZAND, C.; MAZUYA, C.; PREVOSTB, G.; LAPEYREC, C.;
BESD, M.; BRUND, Y.; FLEURETTED, J. Enterotoxin production by coagulase-
negative staphylococci isolated from goats milk and cheese. **International
Journal of Food Microbiology**, v.30, p. 271-280, 1996.

CAPÍTULO III

POTENCIAL DE ADESÃO E DE FORMAÇÃO DE BIOFILME POR *Staphylococcus* spp. ISOLADOS DE ABATEDOURO DE AVES

RESUMO

A formação de biofilmes por *Staphylococcus* spp. é uma estratégia de sobrevivência do micro-organismo e na indústria de alimentos representa uma fonte importante de contaminação cruzada. Avaliaram-se as características fenotípicas e genotípicas de formação de biofilmes por 65 estirpes de *Staphylococcus* spp. isoladas de uma unidade de abate de aves. Todas as estirpes de *Staphylococcus* spp. formaram colônias pretas e opacas em Ágar Vermelho Congo (CRA). A variação do teor de sacarose foi crítica para a produção de exopolissacarídeo (EPS) em CRA, uma vez que em baixas concentrações de sacarose, todas as estirpes apresentaram resultado característico da não produção de EPS. O gene *atl* foi encontrado em todas as estirpes e os genes *icaA* e *icaD* em 97 % delas. Estes dados sugerem que *Staphylococcus* spp. isolados de abatedouro de aves apresentam potencial para formação de biofilme. Formas eficientes de controle desse micro-organismo no ambiente de processamento de alimentos são necessárias visto que podem representar risco em potencial ao consumidor.

Palavras chave: *Staphylococcus*, genes *atl*, *icaA*, *icaD*, biofilme.

1. Introdução

A presença de *Staphylococcus aureus* em alimentos é frequentemente associada à higiene inadequada por parte dos manipuladores que são usualmente carreadores desta bactéria (GUNDOGAN et al., 2005).

Vários tipos de alimentos são implicados como causa de intoxicações gastrointestinais por *S. aureus*, sendo frequentemente relacionados ao consumo de carne e derivados, por suas características favoráveis de atividade de água, pH e nutrientes e extensiva manipulação durante o processamento (ANANOU et al., 2005). Este micro-organismo pode persistir em biofilmes por longos períodos de tempo e ser transferido de um ponto para outro e causar contaminação no ambiente de processamento de alimentos (SHALE et al., 2005).

A capacidade de *S. aureus* em produzir biofilmes é dependente das condições ambientais, o que sugere que há um mecanismo que detecta e responde a sinais do ambiente relacionados à expressão dos genes envolvidos nos processos de adesão (TOLEDO-ARANA et al., 2005).

Proteínas de superfície bacteriana contribuem consideravelmente para a adesão e foram identificadas como sendo importantes para a formação do biofilme estafilocócico (HALL-STOODLEY, 2004). As autolisinas *atlA*, autolisina de *S. aureus* (OSHIDA et al., 1995), e *atlE*, autolisina de *S. epidermidis* (HEILMANN et al., 1997) pertencem a um grupo de peptidoglicano hidrolases que desempenham um papel fundamental na degradação da parede celular bacteriana e durante a divisão celular são responsáveis pela separação do septo entre duas células filhas (ZOLL et al., 2010).

A *atl* é predominante em estafilococos, sendo *atlA* e *atlE* semelhantes em sequência e propriedades. São enzimas bifuncionais, compostas por uma amidase e uma glucosamidase. Mutantes de *S. aureus* e *S. epidermidis* com deleção em *atlA* e *atlE* são deficientes na fixação primária a superfície, o que resulta em não formação do biofilme (BISWAS et al., 2006).

Vários genes estão envolvidos na produção de biofilme estafilocócico (VALLE et al., 2003; CERCA et al., 2008), no entanto os mecanismos reguladores ainda são mal compreendidos (RODE et al., 2007). Há um consenso que os principais determinantes no mecanismo de formação do biofilme por *Staphylococcus* são mediados pela produção da adesina capsular

polissacarídica (PS/A) e da adesina intercelular polissacarídica (PIA) ou poly-N-succinil- β -1,6-glucosamina, cuja síntese é codificada pelos genes produtos do *locus ica* do operon *icaABCD* (BEENKEN et al., 2003; STANLEY e LAZAZZERA, 2004; YAZDANI et al., 2006). Os genes e produtos do *locus ica* são considerados fundamentais para a formação de biofilme e virulência do gênero *Staphylococcus*, sendo regulados em resposta a fatores ambientais, como glicose, anaerobiose, alta osmolaridade, alta temperatura, limitação de etanol e ferro (STANLEY e LAZAZZERA, 2004).

A adesina capsular polissacarídica (PS/A) é responsável pela adesão primária à superfície celular e em seguida multicamadas de células podem ser formadas associadas à produção da PIA (ARCIOLA et al., 2001; VASUDEVAN et al., 2003; YAZDANI et al., 2006). A PIA está envolvida no acúmulo celular de *Staphylococcus* spp. nas superfícies, na hemaglutinação e também age na adesão intercelular em vidro e outras superfícies hidrofílicas (ARCIOLA et al., 2001). Genes do operon *ica* podem ser encontrados em até 100 % de isolados clínicos de *S. aureus* (RODE et al., 2007), tendo sido demonstrado que os genes *icaA* e *icaD* desempenham importante papel na formação dos biofilmes por *S. aureus* e *S. epidermidis* (ARCIOLA et al., 2001; VASUDEVAN et al., 2003; YAZDANI et al., 2006).

Técnicas moleculares para identificação dos genes *ica*, que codificam proteínas utilizadas na síntese do exopolissacarídeo, representam uma ferramenta muito importante para identificação detalhada de estirpes virulentas. O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial de produção de biofilme em estirpes de *Staphylococcus* spp. isoladas em uma unidade de abate de aves.

2. Material e métodos

2.1. Espécies bacterianas

Utilizou-se neste estudo as estirpes do gênero *Staphylococcus* spp. pertencentes ao banco de culturas do Laboratório de Microbiologia de Patógenos de Origem Alimentar e Hídrica (LAMPOAH) da Universidade Federal de Viçosa, Brasil (Tabela 1).

Tabela 1 – Relação das estirpes de *Staphylococcus* spp. avaliadas quanto ao potencial de formação de biofilme

Espécie (s)	Quantidade	Coagulase		Origem
		positiva	negativa	
<i>Staphylococcus aureus</i>	35	22	13	Manipulador ^a
<i>Staphylococcus aureus</i>	5	3	2	Superfície ^b
<i>Staphylococcus aureus</i>	14	12	2	Carcaça de frango ^c
<i>Staphylococcus aureus</i>	4	4	-	Utensílio ^d
<i>Staphylococcus</i> spp.	3	1	2	Manipulador ^a
<i>Staphylococcus</i> spp.	1	1	-	Superfície ^b
<i>Staphylococcus</i> spp.	3	3	-	Utensílio ^d
Estirpes de referência				
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538)				
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)				
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (ATCC12228)				

As estirpes foram isoladas: ^amãos de manipuladores do abatedouro de aves; ^bsuperfícies (calha) de aço inoxidável AISI 304 tipo 4; ^ccarcaças de frango; ^dfacas e chairas utilizadas no abatedouro de aves.

2.2. Avaliação fenotípica da produção de exopolissacarídeo

A produção de exopolissacarídeo (EPS) foi avaliada por meio do cultivo das estirpes em Ágar Vermelho Congo (CRA) segundo metodologia modificada de Freeman et al. (1989). O meio de cultivo foi preparado adicionando-se 0,8 g de corante vermelho congo (Merck[®]) em 1L de Ágar Infusão de Cérebro e Coração (BHI, Himedia[®]) adicionado de diferentes quantidades de sacarose (50 g, 25 g, 12,5 g, 6,25 g, 3,13 g) e não adicionado de sacarose. Os isolados bacterianos foram estriados em placas de Ágar Vermelho Congo e incubados a 37 °C por 24 horas, seguido de incubação à 25 °C por mais 24 horas. Foram utilizadas também as estirpes de *S. aureus* (ATCC 25923) e *S. epidermidis* (ATCC 12228), para fins de controle positivo e negativo, respectivamente.

2.3. Extração do DNA genômico

Os isolados de *Staphylococcus* spp. foram incubados em estufa B.O.D. (Fanem[®]) a 37 °C, por 18 horas em 5 mL de caldo BHI (Himedia[®]). O DNA dos isolados foi extraído a partir de um mililitro da cultura bacteriana que foi centrifugado (Jouan[®] CR3i) a 12000 x g a 4 °C por 2 minutos. O sobrenadante foi descartado e, ao sedimento, adicionou-se 60 µL de solução de lise (sacarose 20 %, Na₂HPO₄ 0,01 mol.L⁻¹, pH 7,0) e lisozima (USB[®]) (0,1 g.mL⁻¹

acrescentada no momento da extração) com incubação a 37 °C por 1 hora em banho-maria. Decorrido este tempo, adicionou-se 3 µL de proteinase K (Sigma®) (20 mg.mL⁻¹), 507 µL de tampão TE 10:1 (Tris-HCl 10 mmol.L⁻¹, pH 7,5; EDTA 1 mmol.L⁻¹), 30 µL de SDS (Amresco®) 10 %, misturou-se e incubou-se a 37 °C por 30 minutos. Posteriormente, adicionou-se 5 µL de RNase (Sigma®) e incubou-se a 25 °C por 2 minutos, e então acrescentou-se 100 µL de NaCl (Vetec®) 5 mol.L⁻¹, 80 µL de hexadeciltrimetilamônio (CTAB (SIGMA®) 2 %: NaCl 0,7 M (1:1) e incubou-se a 65 °C por 10 minutos. Em seguida, foram adicionados 750 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), e a suspensão foi agitada por 1 minuto e centrifugada (Jouan®) a 12000 x g por 15 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro tubo, ao qual foi adicionado 750 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) seguido de centrifugação por 10 minutos. O sobrenadante foi novamente transferido para outro microtubo, sendo adicionado de aproximadamente 500 µL de isopropanol 100 % e armazenado a -20 °C por 18 horas. Após este período, fez-se uma nova centrifugação a 12000 x g por 15 minutos e descartou-se o sobrenadante. Adicionou-se 1,5 mL de etanol 75 %, misturou-se levemente por 5 minutos, centrifugou-se novamente por 2 minutos, descartou-se o sobrenadante. Este procedimento foi repetido por duas vezes. O centrifugado foi seco em estufa à 37 °C por 5 min (Fanem®), e então adicionou-se 100 µL de tampão TE 10:1 (Tris-HCl 10 mmol.L⁻¹, pH 7,5; EDTA 1mmol.L⁻¹). O DNA foi quantificado em espectrofotômetro com comprimento de onda de 260 nm (NanoDrop®).

2.4. Reação de PCR para a identificação dos genes *icaAD* e *atl*

Os oligonucleotídeos iniciadores (Sigma®) utilizados para a amplificação dos genes *icaAD* e *atl* são descritos na Tabela 2. As reações foram realizadas separadamente e consistiram de uma mistura de 0,4 µmol.L⁻¹ de cada oligonucleotídeo, 0,3 µmol.L⁻¹ de dNTP, 1,5 mM do MgCl₂, tampão da enzima Taq DNA polimerase (Promega®) na concentração de 1x, 1 µL (50 ng) do DNA genômico e 1 U da Taq DNA polimerase (Promega®) para um volume final de 25 µL. As condições de amplificação em termociclador (Axigen®) consistiram de uma etapa de desnaturação a 94 °C por 5 min, seguida por 30 ciclos térmicos, cada um consistindo de 94 °C por 30 segundos, 55 °C por 30 segundos e 72 °C por 30 segundos, com uma etapa de extensão final de 72 °C

por 5 min. Foi utilizado como controle positivo a estirpe padrão de *S. aureus* (ATCC 6538). Cinco microlitros do produto amplificado foram visualizados em transiluminador utilizando o sistema de Fotodocumentação Quantum ST4 – 1000/26mX após realização de eletroforese em gel de agarose 1 %. Foi utilizado um marcador molecular de tamanho 100 pb (BioLabs®).

Tabela 2 - Sequência de oligonucleotídeos utilizados na PCR

Genes	Sequência (5'-3')	Referências
<i>atl</i>	F – GCC TGT TGC AAA GTC AAC AA R – CAC CGA CAC CCC AAG ATA AG	MCLAUGHLIN e HOOGEWERF, 2006.
<i>icaA</i>	F – TGA ACC GCT TGC CAT GTG R – CAC GCG TTG CTT CCA AAG A	RODE et al., 2007.
<i>icaD</i>	F – GGG TGG ATC CTT AGT GTT ACA ATT TT R – TGA CTT TTT GGT AAT TCA AGG TTG TC	KOREM et al., 2010.

3. Resultados e discussão

3.1. Detecção fenotípica da produção de exopolissacarídeo

Colônias de cor preta e textura rugosa foram utilizadas para diferenciar aquelas estirpes produtoras de EPS de estirpes não produtoras, as quais se apresentaram como colônias lisas e vermelhas. Todas as estirpes apresentaram coloração preta e opaca em Ágar Vermelho Congo (CRA) com 50 g.L⁻¹ de sacarose, nas primeiras 24 horas de incubação (Figura 1A).

Arciola et al. (2002) descreveram uma escala de seis cores para classificar as colônias produtoras de exopolissacarídeo em Ágar Vermelho Congo (CRA), como muito pretas, pretas e quase pretas, que foram consideradas como resultados positivos, e bordô, vermelhas e muito vermelhas, interpretado como resultado negativo.

Com base nesta classificação as colônias estudadas variaram entre muito pretas a quase pretas, consideradas como positivas para a produção de EPS. Foi possível observar diferenças na intensidade da coloração preta da colônia, sendo que após 48 h algumas colônias apresentaram-se com o centro mais avermelhado e maior difusividade da coloração preta no meio de cultivo como consequência da produção continuada de EPS (Figura 1).

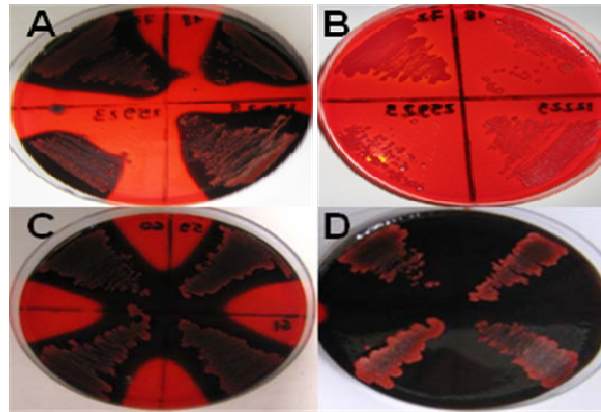


Figura 1 - Colônias de estirpes de *Staphylococcus* produtoras de exopolissacarídeo em Ágar Vermelho Congo com 50 g.L⁻¹ de sacarose. A – colônias pretas ou quase pretas (positivas); B – colônias lisas e vermelhas (negativas); C – colônias positivas com 24 h de incubação; D – colônias positivas com 48 h de incubação.

A alta prevalência da produção do EPS pelas estirpes avaliadas que está diretamente relacionada com a possibilidade de formação de biofilme, ressalta a responsabilidade dos profissionais envolvidos na cadeia produtiva de alimentos quanto à adoção de medidas higiênico-sanitárias, uma vez que a formação de biofilme no ambiente industrial por *Staphylococcus* spp. pode ocorrer em questão de horas. Dentro deste contexto, a crescente automatização das indústrias e o emprego de equipamentos sofisticados, tendem a dificultar os processos de limpeza e propicia um grande número de nichos para a adesão e crescimento de micro-organismos, o que contribui para o aumento dos biofilmes com conseqüente comprometimento da inocuidade dos alimentos e eficiência dos equipamentos.

A variação do teor de sacarose no meio de cultivo mostrou-se importante para a produção de EPS em Ágar Vermelho Congo, uma vez que os resultados demonstram que concentrações de sacarose no meio de cultivo inferiores a 6,25 g.L⁻¹ nas condições estudadas podem limitar a expressão do gene, as quais se apresentaram como colônias vermelhas e lisas, o que caracteriza resultado negativo para a produção de EPS (Figura 2). Entretanto, após 48 h de incubação, a concentração de 6,25 g.L⁻¹ de sacarose no meio de cultivo apresentou-se como fator limitante para a produção de EPS, devido à diminuição da difusividade da coloração preta das colônias, provavelmente devido à incubação em meio de cultivo contendo baixa concentração de sacarose por maior período de tempo (Figura 3).

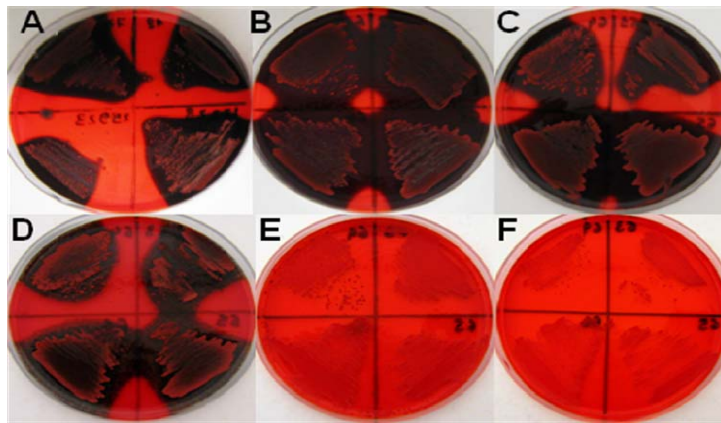


Figura 2 - Produção de exopolissacarídeo de acordo com o teor de sacarose em Ágar Vermelho Congo. A – 50 g.L⁻¹ de sacarose; B – 25 g.L⁻¹ de sacarose; C – 12,5 g.L⁻¹ de sacarose; D – 6,25 g.L⁻¹ de sacarose; E – 3,13 g.L⁻¹ de sacarose; F – sem adição de sacarose.

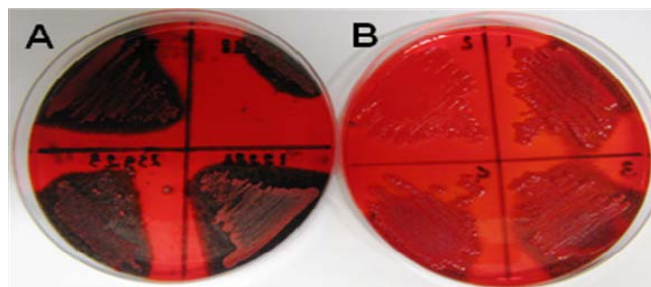


Figura 3 - Diminuição da difusividade da coloração preta em concentração de 6,25 g.L⁻¹ de sacarose. A – 24 h de incubação; B – 48 de incubação.

Pesquisadores sugerem que a síntese da PIA pode ser regulada pela presença de uma fonte de carboidrato no meio que expressa fenótipos positivos na formação de biofilme em *Staphylococcus* (RACHID et al., 2000; . BALDASSARI et al., 2001; DOBINSKY et al., 2003).

Estudos conduzidos por Rachid et al. (2000) e Dobinsky et al. (2003) indicaram que a expressão dos genes do operon *ica* em espécies do gênero *Staphylococcus* está sujeita a regulamentação ambiental de forma que certos nutrientes e substâncias químicas, como glicose, meio ácido, sal, ácido salicílico e concentrações sub-inibitória de antibióticos tem efeitos sobre a transcrição de genes de virulência. Estes dados são corroborados por Moretro et al. (2003) que demonstraram a importância de glicose e NaCl na formação de biofilme pela indução do operon *icaABCD*. Isto demonstra claramente que

as condições de processamento de alimentos podem promover a formação de biofilme por *S. aureus*.

Diversos estudos mostram que estafilococos coagulase negativa podem produzir substância extracelular durante seu crescimento sobre superfícies inertes, as quais facilitam a adesão e a formação do biofilme (FREEMAN et al., 1989; BERNARDI et al., 2007; OLIVEIRA, 2009). Dados estes que confirmam os resultados observados, uma vez que todos os isolados incluindo os estafilococos coagulase negativa apresentaram formação de biofilme em CRA.

Assim, ressalta-se a importância de mais estudos relacionados às estirpes de estafilococos coagulase negativa, pois também podem apresentar fatores de virulência que comprometem a qualidade dos alimentos e em consequência a saúde do consumidor.

3.2. Presença dos genes *atl*, *icaA* e *icaD*

Todas as estirpes apresentaram o gene *atl*, predominante no gênero *Staphylococcus* (Figura 4A) com produtos de amplificação de 600 pb. A adesão de *S. epidermidis* em superfícies abióticas é regulada principalmente pela hidrofobicidade da superfície da célula bacteriana promovida por proteínas específicas como *atl* (OTTO et al., 2009). Por outro lado mutantes são menos hidrofóbicos e formam biofilmes irregulares (HALL-STOODLEY, 2004).

Os genes *icaA* e *icaD* (Figura 4B e 4C) com produto de amplificação de 300 pb foram encontrados em 97 % das estirpes de *Staphylococcus* spp. Estes resultados indicam um alto índice de linhagens potencialmente produtoras de biofilme, uma vez que a presença dos genes *icaAD* está associada com a produção de polissacarídeos extracelulares fundamentais para a formação de biofilme e virulência dos micro-organismos (CRAMTON et al., 1999; MORETRO et al., 2003; STANLEY e LAZAZZERA, 2004; BERNARDI, 2005; RODE et al., 2007).

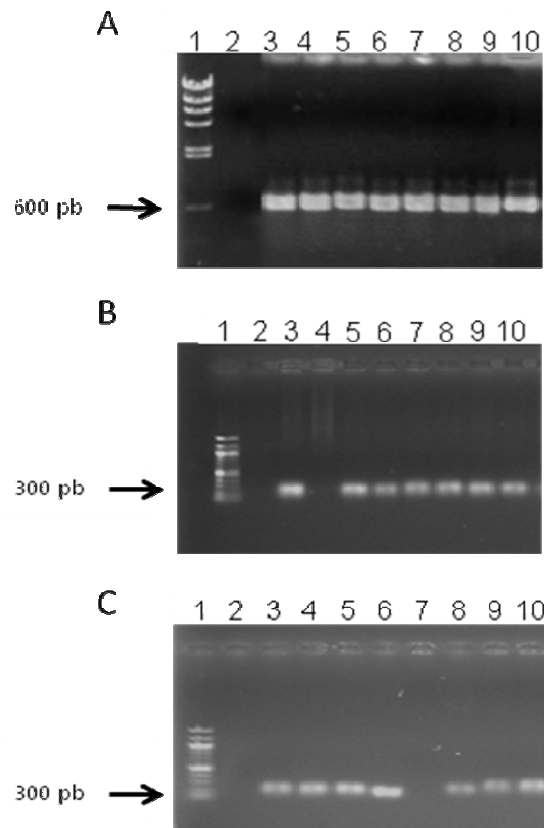


Figura 4 - Identificação molecular de genes envolvidos no processo de adesão de *Staphylococcus* spp. A - Identificação molecular do gene *atI* (Linha1: marcador molecular 100 pb; Linha 2: controle negativo; Linha 3 à linha 10: resultados positivos); B - Identificação molecular do gene *icaA* (Linha1: marcador molecular 100 pb; Linha 2: controle negativo; Linha 3, e linhas 5 à 10: resultado positivo; Linha 4: resultado negativo); C - Identificação molecular do gene *icaD* (Linha 1: marcador molecular 100 pb; Linha 2: controle negativo; linhas 3 à 6 e linhas 8 à 10: resultado positivo; Linha 7: resultado negativo).

A formação de biofilme em poliestireno e em aço inoxidável por estirpes de *Staphylococcus* sp. isolados da indústria de alimentos foi estudada por Moretro et al. (2003), os quais verificaram correlação entre o locus *ica* e a formação de biofilme. Outros resultados semelhantes foram observados por Vasudevan et al. (2003) e Melo (2008), os quais determinaram a presença dos genes *icaAD* em 100 % e 95,7 %, respectivamente em isolados de *S. aureus* oriundos de casos de mastite bovina. Cramton et al. (1999) encontraram 100 % de produção de biofilme pelas estirpes de *S. aureus* isoladas de diferentes infecções humanas com a presença dos genes *icaA* e *icaD*.

Cramton et al. (1999) demonstraram que espécies do gênero *Staphylococcus* controlam a etapa de adesão célula-célula na formação do biofilme por meio do locus *ica* e que a deleção dos genes *ica* elimina a capacidade de produzir PIA e formar biofilme *in vitro*.

Entretanto, dentre as estirpes avaliadas, 3 % não possuíram o produto de PCR dos genes *icaA* e *icaD*, mas apresentaram características de produção de EPS *in vitro*. Resultados semelhantes foram observados por Chaieb et al. (2005) ao relacionarem a presença dos genes *icaAD* e a produção de EPS em CRA por estirpes do gênero *Staphylococcus*. Estes autores identificaram que 3,12 % das estirpes *icaA* e *icaD* negativo produziram EPS *in vitro*. Schelegelová et al. (2008) constataram 1,1 % de estirpes *ica*-negativas de *S. epidermidis* que produziam EPS *in vitro*.

Segundo Grinholc et al. (2007), não é possível determinar com base na detecção de apenas um dos genes *ica* se a estirpe tem potencial para produção do biofilme, pois existe uma variação considerável na expressão gênica entre as estirpes de *Staphylococcus*.

Diante dos resultados apresentados ressalta-se que a capacidade de *Staphylococcus* em produzir EPS nem sempre está associada à presença dos genes *icaA* e *icaD* e que provavelmente pode estar relacionada à presença de outros genes presentes no locus *ica* como *icaB* ou *icaC* que não foram pesquisados neste estudo.

Pesquisadores sugerem que a expressão dos genes *ica* e, conseqüentemente a síntese da PIA e formação de biofilme podem ser induzidos por condições de estresse e, que fatores alternativos como *sigB*, *icaR*, dentre outros estão podem estar envolvidos na expressão dos genes do locus *ica* (MACK et al., 2000; RACHID et al., 2000; KNOBLOCH et al., 2001; VALLE et al., 2003; CERCA et al., 2008).

Moretro et al (2003) sugerem ser mais adequado utilizar a formação de biofilme e não a presença ou ausência do locus *ica* como um dos critérios para determinar estirpes potencialmente virulentas, pois a formação de biofilme em superfícies inertes é altamente sensível às condições ambientais e nutricionais, como presença de etanol, ferro, variação da concentração de glicose e NaCl, entre outros. Isto demonstra que se deve ter cuidado antes de tirar conclusões gerais sobre a expressão gênica em *S. aureus* em relação a formação de biofilme.

4. Conclusão

A combinação de métodos fenotípicos e genotípicos empregados neste estudo permitiu o rastreamento de estirpes do gênero *Staphylococcus* potenciais formadoras de biofilmes, uma vez que a formação de biofilmes trata-se de uma estratégia de sobrevivência deste gênero de bactéria. Os resultados apresentados são relevantes para a segurança alimentar, que indicam que as condições de processamento de alimentos podem promover a formação de biofilme por *S. aureus*.

CONCLUSÕES GERAIS

Entre as colônias isoladas, identificou-se por técnicas bioquímicas e moleculares um alto percentual de estirpes do gênero *Staphylococcus* e da espécie *S. aureus*, inclusive toxigênicas. Além disso, observou-se a ocorrência de linhagens resistentes aos antimicrobianos testados, o qual também foram caracterizadas como linhagens potenciais produtoras de biofilme.

Porém, ainda há a necessidade de mais estudos relacionados aos mecanismos de regulação de formação de biofilme por *Staphylococcus* de origem alimentar, devido principalmente as variações genéticas apresentadas entre as linhagens.

Neste sentido, a pesquisa e caracterização do gênero *Staphylococcus* assume grande importância, uma vez que este micro-organismo pode ser inserido na indústria por todos os profissionais envolvidos na produção de alimentos, que devem estar cientes da importância do controle da formação de biofilme por *Staphylococcus*, pois esta formação pode ser promovida em condições utilizadas na indústria de alimentos e desencadear surtos de intoxicação alimentar, inclusive por estirpes de estafilococos coagulase negativa.

5. Referências

- ANANOU, S.; MAQUEDA, M.; MARTÍNEZ-BUENO, M.; GÁLVEZ, A.; VALDIVIA, E. Control of *Staphylococcus aureus* in sausages by enterocin AS-48. **Meat Science**, v.71, p.549–556, 2005.
- ARCIOLA, C.R.; CAMPOCCIA, D.; GAMBERINI, S.; CERNELLATI, M.; DONATI, E.; MONTANARO, L. Detection of slime production by means of an optimized Congo red agar plate based on a colorimetric scale in *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates genotyped for *ica* locus. **Biomaterials**, v. 23, n. 21, p. 4233-4239, 2002.
- ARCIOLA, C.R.; BALDASSARRI, L.; MONTANARO, L. Presence of *icaA* and *icaD* Genes and Slime Production in a Collection of Staphylococcal Strains from Catheter-Associated Infections. **Journal of Clinical Microbiology**, p. 2151–2156, 2001.
- BALDASSARRI, L.; BERTUCCINI, L.; AMMENDOLIA, M.G.; ARCIOLA, C.R.; MONTANARO, L. Effect of Iron Limitation on Slime Production by *Staphylococcus aureus*. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Disease**, v.20, p.343–345, 2001.
- BEENKEN, K.E.; BLEVINS, J. S.; SMELTZER, M.S. Mutation of *sarA* in *Staphylococcus aureus* Limits Biofilm Formation. **Infection and Immunity**, p. 4206–4211, 2003.
- BERNARDI, A.C.A.; PIZZOLITTO, E. L.; PIZZOLITTO, A.C. Detecção da produção de *slime* por estafilococos coagulase-negativa isolados de cateter venoso central. **Revista de Ciências Farmaceuticas Básica e Aplicada**, v. 28, n.1, p.57-66, 2007.
- BERNARDI, A.C.A. **Estudo de Amostras de *Staphylococcus coagulase-negativos* Quanto a Formação de Biofilme**. Tese de Doutorado em Análises Clínicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Campus de Araraquara, Araraquara-Sp, 2005.
- BISWAS, R.; VOGGU, L.; SIMON, U.K.; HENTSCHEL, P.; THUMM, G. Activity of the major staphylococcal autolysin Atl. **FEMS Microbiology Letters**, v. 259, p. 260-268, 2006.
- CERCA, N; BROOKS, J. L.; JEFFERSON, K. K. Regulation of the Intercellular Adhesin Locus Regulator (*icaR*) by SarA, δ^B , and IcaR in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**, v. 190, n. 19 p. 6530–6533, 2008.
- CHAIEB, K.; MAHDOUANIA, K.; BAKHROUF, A. Detection of *icaA* and *icaD* loci by polymerase chain reaction and biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis* isolated from dialysate and needles in a dialysis unit. **Journal of Hospital Infection**, n.61, p.225–230, 2005.
- CRAMTON, S. E.; GERKE, C.; SCHNELL, N. F.; NICHOLS, W. W.; GOTZ, F. The intercellular adhesion (*ica*) locus is presente in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. **Infection and Immunity**, v.67, p. 5427- 5433, 1999.

- DOBINSKY, S.; KIEL, K.; ROHDE, H.; BARTSCHT, K.; KNOBLOCH, J. K.-M.; HORSTKOTTE, M. A.; MACK, D. Glucose-Related Dissociation between *icaADBC* Transcription and Biofilm Expression by *Staphylococcus epidermidis*: Evidence for an Additional Factor Required for Polysaccharide Intercellular Adhesin Synthesis. **Journal of Bacteriology**, v. 185, n. 9, p. 2879–2886, 2003.
- FREEMAN, D. J.; FALKINER, F. R.; KEANE, C. T. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. **Journal of Clinical Pathology**, n.42, p.872-874, 1989.
- GRINHOLC, M.; WEGRZYN, G.; KURLEND, J. Evaluation of biofilm production and prevalence of the *icaD* gene in methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strains isolated from patients with nosocomial infections and carriers. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.50, p.375–379, 2007.
- GUNDOGAN, N.; CITAK, S.; YUCEL, N.; DEVREN, A. A note on the incidence and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from meat and chicken samples. **Meat Science**, v.69, p.807-810, 2005.
- HALL-STOODLEY, L.; COSTERTON, J.W.; STOODLEY, P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2. p. 95-108, 2004.
- HEILMANN, C.; HUSSAIN, M.; PETERS, G.; GÖTZ, F.; Evidence for autolysin-mediated primary attachment of *Staphylococcus epidermidis* to a polystyrene surface. **Molecular Microbiology**, v. 24, p. 1013-1024, 1997.
- KNOBLOCH, J. K.-M.; BARTSCHT, K.; SABOTTKE, A.; ROHDE, H.; FEUCHT, H.-H.; MACK, D. Biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis* depends on functional RsbU, an activator of the *sigB* operon: differential activation mechanisms due to ethanol and salt stress. **Journal of Bacteriology**, v.183, n. 8, p. 2624–2633, 2001.
- KOREM, M.; GOV, Y.; ROSENBERG, M. Global gene expression in *Staphylococcus aureus* following exposure to alcohol. **Microbial Pathogenesis**, n.48, p. 74–84, 2010.
- MACK, D.; ROHDE, H.; DOBINSKY, S.; RIEDEWALD, J.; NEDELMANN, M.; KNOBLOCH, J. K.-M.; ELSNER, H.-A.; FEUCHT, H.-H.; Identification of three essential regulatory gene loci governing expression of *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin and biofilm formation. **Infection and Immunity**, v.68, n. 7, p.3799–3807, 2000.
- MCLAUGHLIN, R.A.; HOOGEWERF, A.J. Interleukin-1 β -induced growth enhancement of *Staphylococcus aureus* occurs in biofilm but not planktonic cultures. **Microbial Pathogenesis**, v.41, p. 67-69, 2006.
- MELO, P. C. **Estudo fenotípico e genotípico da produção de biofilmes por estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas dos casos de mastite subclínica bovina.** Dissertação de mestrado, UNESP, Jaboticabal, SP, 2008. 122p.
- MORETRO, T.; HERMANSEN, L.; HOLCK, A. L.; SIDHU, M. S.; RUDI, K.; LANGSRUD, S. Biofilm Formation and the Presence of the Intercellular Adhesion Locus *ica* among *Staphylococci* from Food and Food Processing Environments. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 9, p. 5648–5655, 2003.

- OLIVEIRA, A. **Comparacao de Metodos de Deteccao de Biofilme em Estafilococos Coagulase-Negativa Provenientes de Infecoes em Recem-Nascidos**. Dissertação de mestrado, UNESP, Campus de Botucatu, 2009.101p.
- OTTO, M. *Staphylococcus epidermidis* — the ‘accidental’ pathogen. **Nature Reviews Microbiology**, v.7, p. 555-567, 2009.
- OSHIDA, T.; SUGAI, M.; KOMATSUZAWA, H.; HONG, Y.; SUGINAKA, H.; TOMASZ, A.A. *Staphylococcus aureus* autolysin that has an *N*-acetylmuramoyl-L-alanine amidase domain and an endo- β -*N*-acetylglucosaminidase domain: Cloning, sequence analysis, and characterization. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 92, p. 285-289, 1995.
- RACHID, S.; OHLSEN, K.; WALLNER, U.; HACKER, J.; HECKER, M.; ZIEBUHR, W. Alternative transcription factor δ^B is involved in regulation of biofilm expression in a *Staphylococcus aureus* mucosal isolate. **Journal of Bacteriology**, v.182, n.23, p.6824–6826, 2000.
- RODE, T. M.; LANGSRUD, S.; HOLCK, A.; MORETRO, T. Different patterns of biofilm formation in *Staphylococcus aureus* under food-related stress conditions. **International Journal of Food Microbiology**, n.116, p.372–383, 2007.
- SCHELEGELOVÁ, J.; BABÁK, V.; HOLASOVÁ, M.; DENDIS, M. The biofilm-positive *Staphylococcus epidermidis* isolates in raw materials, foodstuffs and on contact surfaces in processing plants. **Folia Microbiol.**, n.53, v.6, p.500-504, 2008.
- SHALE, K.; LUES, J.F.R.; VENTER, P.; BUYS, E.M. The distribution of *Staphylococcus* sp. on bovine meat from abattoir deboning rooms. **Food Microbiology**, v.22, p.433-438, 2005.
- STANLEY, N.R.; LAZAZZERA, B.A. Environmental signals and regulatory pathways that influence biofilm formation. **Molecular Microbiology**, Oxford, v.52, n.4, p.917-924, 2004.
- TOLEDO-ARANA, A.; MERINO, N.; VERGARA-IRIGARAY, M.; DÉBARBOUILLÉ, M.; PENADÉS, J. R.; LASA, I. *Staphylococcus aureus* Develops an Alternative, *ica*-Independent Biofilm in the Absence of the *arlRS* Two-Component System. **Journal of Bacteriology**, p. 5318–5329, 2005.
- VALLE, J.; TOLEDO-ARANA, A.; BERASAIN, C.; GHIGO, J.-M.; AMORENA, B.; PENADÉS, J. R.; LASA, I. SarA and not δ^B is essential for biofilm development by *Staphylococcus aureus*. **Molecular Microbiology**, v.48, n. 4, p.1075–1087, 2003.
- VASUDEVAN, P.; NAIR, M. K. M.; ANNAMALAI, T. ; VENKITANARAYANAN, K. S. Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. **Veterinary Microbiology**, n.92 p.179–185, 2003.
- YAZDANI, R.; OSHAGHI, M.; HAVAYI, A.; PISHVA, E.; SALEHI, R.; SADEGHIZADEH, M.; FOROOHESH, H. Detection of *icaAD* gene and biofilm formation in *Staphylococcus aureus* isolates from wound infections. **Iranian Journal of Public Health**, v. 35, n. 2, p.25-28, 2006.

ZOLL, S.; PÄTZOLD, B.; SCHLAG, M.;GÖTZ, F.; KALBACHER, H.; STEHLE, T. Structural Basis of cell wall cleavage by a staphylococcal autolysin. **PLoS Pathogens**, v.6, n. 3, p.1-13, 2010.